SYNTHESE MEMBRANMODIFIZIERENDER PROTEINSEGMENTE MIT KONFORMATIONSSTABILISIERTEN LIPOPHILEN α-HELICES

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Becker
aus Offenburg

1984

SYNTHESE MEMBRANMODIFIZIERENDER PROTEINSEGMENTE MIT KONFORMATIONSSTABILISIERTEN LIPOPHILEN α-HELICES

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Gerhard Becker
aus Offenburg

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 11. September 1984

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Jung
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Bayer

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Günther Jung

in der Zeit von Oktober 1981 bis Juli 1984 im Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Professor Dr. G. Jung danke ich herzlich für die Themenstellung, für sein stetes Interesse an der Arbeit sowie für viele hilfreiche und wertvolle Anregungen.

DANKSAGUNG

Für den biophysikalischen Teil der Arbeit waren zahlreiche Messungen erforderlich. Mein besonderer Dank für die Durchführung dieser Untersuchungen sowie für die Hilfen bei der Interpretation der Meßergebnisse gilt den Mitarbeitern folgender Arbeitsgruppen:

Herrn Dr. V. Rizzo, Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Schwarz, Basel

Herrn Dr. D. Blöcher, Arbeitsgruppe Prof. Dr. K. Ring, Frankfurt

Herrn Dr. W. Praß, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Ringsdorf, Mainz

Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Boheim, Bochum.

Abstract

Becker, Gerhard:

SYNTHESE MEMBRANMODIFIZIERENDER PROTEINSEGMENTE MIT KONFORMATIONSSTABILISIERTEN LIPOPHILEN α-HELICES

Das stark amphiphile Eicosapeptid H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-$(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)_2$-OMe wurde durch klassische Peptidsynthese unter Verwendung von DCC/HOBt- bzw. Mischanhydridkupplungen aufgebaut. Die Synthese erfolgte durch Fragmentkupplung zweier hydrophober und eines hydrophilen Segments. Die N-terminale Dekapeptid-Sequenz stellt die Partialsequenz 11-20 aus menschlichem Lymphoblasteninterferon dar.

Die Zwischenstufen sowie das Eicosapeptid wurden neben den üblichen Charakterisierungen ^{13}C-NMR- und CD-spektroskopisch untersucht. Dabei konnten hohe α-helikale Konformationsanteile nachgewiesen werden. Von dem Eicosapeptid wurden Dipolmoment sowie Länge und Dicke durch dielektrische Messungen bestimmt.

Das Verhalten des Eicosapeptids und der synthetischen Partialsegmente in Lipidphasen wurde mit mehreren Methoden untersucht: a) Differentialcalorimetrie, b) Spreitung von Peptid-Lipid-Mischmonoschichten und c) spannungsabhängige Porenbildung. Nach den Ergebnissen dieser Untersuchungen verhält sich das Eicosapeptid als amphiphiler Membrananker, dessen hydrophiler Teil in der wäßrigen Phase gelöst ist. Es vermag wie Alamethicin spannungsabhängige Ionenleitfähigkeit in Lipid-Bilayern zu induzieren, bildet aber keine stabilen Einzelporen.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Biophysikalische Eigenschaften der Lipidmembran	2
1.2.	Sekundärstruktur membranmodifizierender Peptide	5
1.3.	Membranmodifizierende Eigenschaften von Peptiden	6
1.4.	Problemstellung	11
2.	PEPTIDSYNTHESEN	15
2.1.	Syntheseplan und -strategie	15
2.2.	Auswahl der Kupplungsmethoden	17
2.3.	Reinigungsmethoden und Schutzgruppentaktik	20
2.4.	Darstellung der Segmente A - C	21
2.4.1.	Synthese von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH (Tripeptid, Segment A)	22
2.4.2.	Synthese von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OH (Hexapeptid, Segment B)	23
2.4.3.	Synthese von Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Undekapeptid, Segment C)	24

2.5. Synthese von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Heptadekapeptid) 29

2.6. Synthese von Boc-Asn-Arg(NO$_2$)-Arg(NO$_2$)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (geschütztes Eicosapeptid) 30

2.7. Darstellung von H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (freier Eicosapeptidester) 31

3. ^{13}C-NMR-SPEKTROSKOPIE 33

3.1. Spektrum von Boc-Asn-Arg(NO$_2$)-Arg(NO$_2$)-OMe (Tripeptid, Segment A) 34

3.2. Spektrum von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe (Hexapeptid, Segment B) 36

3.3. Spektren von Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH, Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Dekapeptid) und Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Undekapeptid, Segment C) 40

3.4. Spektrum von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Heptadekapeptid) 50

3.5.	Spektrum von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (geschütztes Eicosapeptid)	53
4.	KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN	69
4.1.	Konformationsvorhersagen	69
4.2.	Circulardichroismus von Peptiden	77
4.2.1.	CD-Spektren der Tri- bis Heptadekapeptid-Segmente und des geschützten Eicosapeptids	79
4.2.2.	CD-Spektren des freien Eicosapeptidesters - Lösungsmittelabhängigkeit	81
5.	BIOPHYSIKALISCHE UNTERSUCHUNGEN	88
5.1.	Bestimmung des Dipolmoments des freien Eicosapeptidesters	88
5.2.	Differentialcalorimetrie der synthetischen Peptid-Zwischenstufen sowie von Alamethicin und Melittin in Lipiden	94
5.2.1.	Methodische Grundlagen der DSC	94
5.2.2.	Ergebnisse und Diskussion	95
6.	Spreitungsexperimente	111
6.1.	Methodische und theoretische Grundlagen	111

6.2.	Ergebnisse und Diskussion	113
7.	Spannungsabhängige Porenbildung in Lipid-Doppelschichtmembranen	117
7.1.	Ergebnisse und Diskussion	118
8.	EXPERIMENTELLER TEIL	129
8.1.	Material und Methoden	129
8.2.	Darstellung der Peptid-Segmente und des freien Eicosapeptidesters	132
9.	ZUSAMMENFASSUNG	142
10.	LITERATURVERZEICHNIS	145

ABKÜRZUNGEN

Aib	α-Aminoisobuttersäure, 2-Methylalanin
ASA	Aminosäurenanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
CD	Circulardichroismus
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid
DCH	Dicyclohexylharnstoff
DMF	Dimethylformamid
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
Hepes	Histidin-N-2-hydroxymethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
TDM	4,4'-Bis-(dimethylamino)diphenylmethan
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

Die Abkürzungen für die Aminosäuren und deren Schutzgruppen entsprechen den IUPAC-Regeln [Eur. J. Biochem. 27, 201-207 (1972) und 74, 1-6 (1977)] .
Bei optisch aktiven Aminosäuren bedeutet das Symbol zugleich die L-Konfiguration.

1. EINLEITUNG

Biologische Membranen sind hochselektive Permeabilitätsschranken und stellen eine wichtige Grundvoraussetzung für den störungsfreien Ablauf biochemischer Prozesse dar. Die genaue Regulation des Molekül- und Ionenflusses durch eine Zellmembran geschieht durch spezifische Transportsysteme. Diese bestehen aus hochmolekularen Carrierproteinen und beziehen die Energie für ihre Transporttätigkeit aus ATP-Hydrolyse ("Na^+-K^+-Pumpe") oder einem Ionengradienten (Na^+-Glucose-Cotransportsystem).

Einige Mikroorganismen synthetisieren Verbindungen, die die Lipidmembran für bestimmte Ionen durchlässig machen. Diese sogenannten Transportantibiotika können auf zweierlei Arten Ionen durch eine Membran schleusen. Die eine Gruppe von Antibiotika, z.B. Valinomycin (1) wird dadurch wirksam, daß sie die Ionen komplexiert und dann durch die Kohlenwasserstoffschicht der Membran transportiert.

Im Gegensatz zu den Komplexbildnern wirkt die andere Gruppe als Kanalbildner. So bildet z.B. Gramicidin A (2) durch Dimerisierung einen Kanal konstanten Durchmessers, der Ionen den Durchtritt durch die Membran ermöglicht.

Eine Reihe membranmodifizierender Peptidantibiotika besitzt die Fähigkeit, in Gegenwart eines elektrischen

Feldes Kanäle oder Poren zu bilden. Zu den am intensivsten untersuchten spannungsabhängigen Ionophoren gehört neben Suzukacillin (3-5) und Trichotoxin (6-8) das Alamethicin (9-15). Diese Peptidantibiotika (16) wurden aus verschiedenen Stämmen des Fadenpilzes Trichoderma viride isoliert.

Nach Einbau in künstliche Lipid-Bilayer-Membranen und Anlegen einer Spannung induzieren diese Peptide Ionenleitfähigkeit der Membran durch Ausbildung von Poren, deren Leitwerte von der Größe der beteiligten Peptidmoleküle abhängt. Die angelegte Spannung liegt dabei in der gleichen Größenordnung wie die Aktionspotentiale in Nervenzellen (50 - 130 mV) (17-20).

1.1. Biophysikalische Eigenschaften der Lipidmembran

Biologische Membranen sind so unterschiedlich wie die Vielfalt ihrer Funktionen. Sie besitzen jedoch eine Anzahl wichtiger Gemeinsamkeiten, die auch für künstlich hergestellte Membranen gelten:

a) Die Membran ist planar und ca. 4 - 10 nm dick,
b) die Lipidmoleküle sind amphiphil (polarer, hydrophiler Kopf, lange, lipophile Kohlenwasserstoffketten),
c) Membranlipide bilden in wäßrigem Medium spontan bimolekulare Filme,
d) der Zusammenhalt der Membrankomponenten erfolgt

durch nichtkovalente Kräfte (van der Waals-Wechselwirkung).

In biologischen Membranen sind eine Vielzahl von funktionellen Proteinen (Pumpen, Rezeptoren, Energieüberträger und Enzyme) eingelagert.

Ein Lipid, das man in den meisten Membranen höherer Organismen vorfindet ist das 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin (1.2-POPC; Abb. 1.1.1).

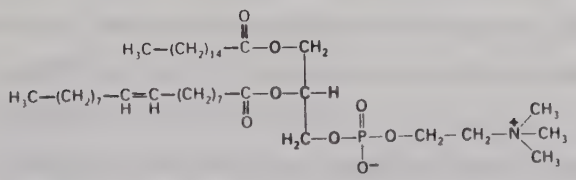


Abb. 1.1.1: Primärstruktur von 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin

In wäßrigem Medium bildet sich bevorzugt die Lipiddoppelschicht aus und zwar in der Weise, daß die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten nach innen und die hydrophile Kopfregion nach außen orientiert ist (Abb. 1.1.2)

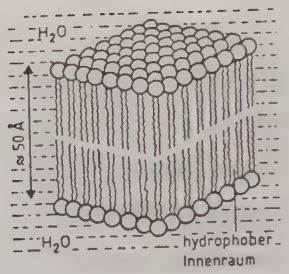


Abb. 1.1.2: Schema einer Membrandoppelschicht aus Phospholipiden

Die Fettsäureketten von Lipidmolekülen in der Doppelschicht können geordnet und damit starr oder ungeordnet, flüssig vorliegen. Bei einer bestimmten "Schmelz"-temperatur geht der starre Zustand in den flüssigen über. Dieser Phasenübergang hängt ab von folgenden Parametern:

a) Länge der Fettsäureketten - Lange Kohlenwasserstoffketten bewirken intensivere Wechselwirkungen als kurze.

b) Anzahl ihrer ungesättigten Verbindungen - Eine cis-Doppelbindung (z.B. im Oleoyl-Rest) verursacht einen Knick, der die optimale Packung der Fettsäureketten verhindert und die betreffende CH_2-Kette flexibler macht.

c) Anzahl eingelagerter Fremdmoleküle - In Gegenwart von Peptiden oder fremden Lipiden wird die Packungsstruktur der Membran zum Teil erheblich gestört (z.B. durch Lysolecithin). In bestimmten

Konzentrationsbereichen wirken diese Moleküle lytisch und zerstören die Membran.
Jeder der drei Faktoren ist in der Lage, die Membranfluidität mehr oder weniger stark zu erhöhen. Die Fluidität biologischer Membranen wird hauptsächlich durch Aus- und Einbau ungesättigter Lipide reguliert.

Insgesamt ist die Membran als ein flüssiges Mosaik aufzufassen (21-27). Nach dem bekannten Modell von Singer und Nicolson stellen biologische Membranen zweidimensionale Lösungen gerichteter globulärer Proteine und Lipide dar.
Voraussetzung für eine stabile Integration von Peptiden und Proteinen in die Lipiddoppelschicht sind hydrophobe Peptid-Sequenzabschnitte, die durch Wechselwirkungen mit den Lipid-Kohlenwasserstoffketten die Verankerung des gesamten Proteins in der Membran garantieren.

1.2. Sekundärstruktur membranmodifizierender Peptide

Die eingangs erwähnten porenbildenden Peptidantibiotika weisen sowohl in der Sequenz als auch in ihrer Konformation und somit in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften große Ähnlichkeit auf. Typisch sind einmal ihr hoher Gehalt an der sonst sehr seltenen α-Aminoisobuttersäure. Weitere Gemeinsamkeiten dieser

Peptide sind ein acetylierter N-Terminus und ein C-terminaler Aminoalkohol mit ein oder zwei benachbarten polaren Aminosäuren, sodaß der C-Terminus hydrophilen Charakter erhält.
Einem Nomenklaturvorschlag von Brückner et al. und Toniolo et al. zufolge werden Peptide dieser Klasse als "Peptaibol"-Antibiotika bezeichnet (28).
Ausführliche Konformationsstudien an Alamethicin in Lösung mittels Circulardichroismus (CD) (29,30) und ^{13}C-NMR-Spektroskopie (29) ergaben als beherrschendes Sekundärstrukturelement eine α-Helix, deren Anteil an der Peptidkonformation von polaren zu lipophilen Lösungsmitteln zunimmt. Eine kürzlich durchgeführte Röntgenstrukturanalyse des Alamethicins bestätigte diese Vorstellungen (31).
Somit weisen sich Alamethicin und Analoga als α-helikale Moleküle mit amphiphilem Charakter aus. Zwischen diesen Strukturmerkmalen und der Fähigkeit, Poren zu bilden besteht ein ursächlicher Zusammenhang, der im folgenden Abschnitt diskutiert wird.

1.3. Membranmodifizierende Eigenschaften von Peptiden

Alamethicin und Analoga zeichnen sich durch antibakterielle und antifungische Wirksamkeit aus (32). Außerdem wurde lytische Aktivität gegenüber Erythrozyten (33),

Leukozyten, Mäuselymphozyten (34), Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung an Mitochrondrien (35) und der Photo-Phosphorylierung an Thylakoiden aus Radischenkeimblättern (36) sowie Stimulation der Guanylat-Cyclase von Paramecien (37) beobachtet.

Eine der interessantesten Eigenschaften dieser Peptide besteht jedoch in der Fähigkeit, in Abhängigkeit einer angelegten Spannung Ionenleitfähigkeit in einer künstlichen oder natürlichen Membran zu induzieren (17). Ausführliche Untersuchungen der spannungsabhängigen Porenbildung in künstlichen Lipid-Bilayern wurden vor allem am Alamethicin durchgeführt (18,19,38,39).

Neben der Ermittlung einer Strom-Spannungs-Charakteristik (15) und der Konzentrationsabhängigkeit der Leitfähigkeit sind vor allem Messungen bei einer angelegten konstanten Gleichspannung ("voltage clamp") besonders interessant. Hierbei wurden Stromfluktuationen beobachtet, die mit der Bildung jeweils einer einzelnen Pore identifiziert werden können. Der Strom fluktuiert zwischen unterschiedlichen Leitwerten und variiert somit in seiner Lebensdauer (100 - 500 ms) und Stärke. Dieses Verhalten weist auf einen veränderlichen Durchmesser der Pore hin. Es konnten bis zu 10 verschiedene Leitwerte nachgewiesen werden, die alle bestimmten

Porengrößen zuzuordnen sind (10,12). Neben den kleinsten Poren, die für Cl^- oder Ca^{2+} undurchlässig sind, können solche entstehen, durch die so voluminöse Ionen wie Tris-H^+ und Hepes$^-$ gelangen.
Die Bildung größerer Poren wird bei Anlegen höherer Spannungen wahrscheinlicher; die Lebensdauer des Zustandes ändert sich dabei nur wenig. Jede Zustandsänderung einer Pore ist mit dem Übergang einer Elementarladung verbunden.
Die bis jetzt verfügbaren experimentellen Befunde aus Leitfähigkeitsuntersuchungen sowie Konformationsstudien an Alamethicin und weiteren Porenbildnern führte zur Entwicklung des sogenannten "Flip-Flop-Gating"-Modells durch Boheim et al. (42), das plausible und detailgetreue Interpretationen verschiedenster Leitfähigkeitsmessungen erlaubt. Andere Vorschläge (31,40,41) sind ohne experimentelle Basis erstellt worden und weder mit den biophysikalischen noch strukturellen Befunden vereinbar.

Eine Peptid-α-Helix besitzt ein Dipolmoment (43,44), das durch vektorielle Aufsummierung von Einzel-Dipolmomenten der Peptidbindungen zustandekommt. Bei Zugabe der Moleküle auf die cis-Seite der Membran (s. Abschn. 7.)

lagern sich die Helices mit dem N-Terminus in Richtung trans-Seite in die Lipidphase ein. Die Moleküle sind dann in der Membran so ausgerichtet, daß sich die partiell positiv geladenen N-terminalen Helixenden auf der trans-Seite und die partiell negativ geladenen C-Termini auf der cis-Seite befinden.
Durch die unter den Helices mit parallelem Dipolmoment herrschenden Abstoßungskräfte driften die Moleküle in der Membran auseinander, d.h. es liegen nur Monomere vor. Durch statistisches "Umflippen" einzelner Helices entsteht eine antiparallele Orientierung, die eine elektrostatische Anziehung der Dipole untereinander bewirkt. Es kommt zur Ausbildung von Aggregaten verschiedener Größe, unter denen das Hexamere aus energetischen und sterischen Gründen begünstigt ist.
Das eigentliche "Porenereignis" findet bei Einschalten eines äußeren elektrischen Feldes, dem Membranpotential, statt. Unter seinem Einfluß richten sich die Helix-Dipole parallel zur Feldrichtung aus. Dieser "Flop" verursacht wiederum eine Abstoßung der Dipole untereinander. Innerhalb der vorgebildeten Aggregate entstehen so Hohlräume: die Poren. Wäßriger Elektrolyt dringt ein und schirmt die Abstoßung der parallelen Helices durch seine hohe Dielektrizitätskonstante ab. Dadurch werden die Moleküle an augenblicklichem Auseinanderdiffundieren gehindert.

Bei ausreichender Stabilität der Pore wie im Falle von Alamethicin können in ein solches Aggregat noch zusätzlich Alamethicin-Moleküle aufgenommen werden; eine größere Pore mit höherem Leitwert entsteht. Umgekehrt kann sich durch Austritt eines oder mehrerer Moleküle aus dieser Anordnung eine Pore kleineren Durchmessers bilden.

Dieses an sich sehr aussagekräftige Modell erfaßt allerdings nicht die subtileren Vorgänge auf molekularer Ebene. So sucht man beispielsweise eine befriedigende Erklärung für die bei verschiedenen Peptiden unterschiedliche Stabilität und Größe von Einzelporen. Im Gegensatz zu synthetischem Alamethicin F-30 vermag Trichotoxin A-40 nur sehr kurzlebige Poren zu bilden; Melittin wiederum besitzt die Fähigkeit zur Ausbildung stabiler Poren. Alle drei genannten Polypeptide sind sich hinsichtlich ihrer Sekundärstruktur sehr ähnlich.

Aus diesen Gründen erscheint es zwingend, die Wechselwirkungen zwischen Peptid und Lipid im Hinblick auf Bildung und Stabilität von Poren in der Modellvorstellung stärker als bisher zu berücksichtigen.

1.4. Problemstellung

Aus den bisherigen Untersuchungen an natürlichen und synthetischen membranmodifizierenden Peptidantibiotika geht hervor, daß folgende notwendigen strukturellen Voraussetzungen für spannungsabhängige Porenbildung gegeben sein müssen:

a) überwiegend helikale Konformation

b) permanentes Dipolmoment

c) amphiphiler Charakter

Obwohl der letzte Punkt nicht ohne weiteres einsichtig ist, muß man aufgrund des experimentellen Tatsachenmaterials die Eigenschaft der Amphiphilie als ein für die Bildung stabiler Poren notwendiges Kriterium auffassen. Eine burstartige Porenbildung wird allerdings auch bei rein aliphatischen Peptidhelices beobachtet (46). Hinsichtlich der Länge des Peptids gilt, daß das Molekül in der Lage sein sollte, die Membran zu überbrücken. In einer α-Helix sind dazu mindestens 20 Aminosäuren erforderlich. Membranüberbrückende Strukturen sind allerdings auch durch Kopf-Schwanz-Anlagerung kürzerer Peptide möglich; hierbei bilden sich Poren erst bei entsprechend höherer Peptidkonzentration.

Aus den unter a - c genannten Tatsachen ergeben sich nun folgende Fragestellungen:

I) Welche Rolle spielt die Amphiphilie eines helikalen Peptids hinsichtlich seiner membranmodifizierenden Eigenschaften?

II) Welchen Einfluß haben terminale, den amphiphilen Charakter des Peptids verstärkende Ladungen?

III) Wie verhält sich ein helikales Peptid mit umgekehrt orientierter Amphiphilie (lipophiler C-Terminus, hydrophiler N-Terminus) bezüglich seiner membranmodifizierenden Eigenschaften?

Diese Problemstellung soll mit der Darstellung und Untersuchung eines geeigneten Modellpeptids aufgegriffen werden. Im einzelnen soll dabei folgendermaßen vorgegangen werden:

a) Darstellung eines Eicosapeptids mit möglichst starrer α-helikaler Sekundärstruktur und ausgeprägtem amphiphilem Charakter. Der hydrophile Teil soll dabei am N-Terminus lokalisiert sein und bis zu drei permanente positive Ladungen tragen.

b) Ausführliche spektroskopische Charakterisierung (^{13}C-NMR, CD) des Zielpeptids sowie der Partialsequenzen zum Zweck der Synthesekontrolle und Konformationsanalyse.

c) Bestimmung des Dipolmoments und der Molekülgröße durch dielektrische Messungen (Arbeitsgruppe Prof.

Dr. G. Schwarz, Basel).

d) Differentialcalorimetrische Untersuchungen (Verschiebung von Phasenübergängen) an Lipidmembranen unter Einbeziehung von Alamethicin und Melittin (Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Ring, Frankfurt).

e) Spreitungsexperimente (Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Ringsdorf , Mainz).

f) Untersuchungen der Porenbildung in Lipid-Bilayern (Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Boheim, Bochum).

Die Wahl der zu synthetisierenden Modellverbindung fiel auf das Eicosapeptid H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe. Die Auswahl dieser Sequenz ist folgendermaßen zu begründen:

Das α-Aminoisobuttersäure enthaltende C-terminale Dekapeptidsegment besitzt eine streng α-helikale Konformation. In Analogie zu Partialsequenzen der Peptaibol-Antibiotika sowie synthetischer Alamethicin-Analoga mit ähnlich hohem Aib-Gehalt (46,47) weist es einen ausgesprochen lipophilen Charakter auf.

Das N-terminale Dekapeptidsegment stellt die Partialsequenz 11-20 des menschlichen Lymphoblasteninterferons HuIFN-α(Ly) dar. Bis auf die drei N-terminalen Aminosäuren dominieren in dieser Sequenz ebenfalls lipophile

Reste mit ausgeprägter Neigung zur α-Helixbildung.

Somit ist dieses Peptid als geeignete Modellverbindung im Hinblick auf die zuvor genannten Fragestellungen anzusehen. Außerdem kann es als Arbeitsmodell für die Entwicklung synthetischer immunreaktiver Peptide dienen, bei denen antigene Proteinsegmente kovalent mit lipophilen Membranankeŕn verknüpft werden. Dies erlaubt eine Präsentation exponierter Proteinbereiche an Zelloberflächen und kann so möglicherweise eine bevorzugte Erkennung und Antikörperbildung auslösen. Da gegen Interferone teilweise schon Antiseren vorhanden sind ließe sich diese Vorstellung auch experimentell überprüfen.

2. PEPTIDSYNTHESEN

2.1. Syntheseplan und -strategie

Der Aufbau des Eicosapeptids durch konventionelle Peptidsynthese ist aus mehreren Gründen jeder Trägersynthese vorzuziehen:

a) Der vollständige Einbau der sterisch anspruchsvollen α-Aminoisobuttersäure im Verlauf einer Trägersynthese ist nicht garantiert.

b) Die durch Fehlsequenzen verursachte Mikroheterogenität des Endprodukts mindert die Aussagekraft der biophysikalischen Experimente.

c) Die konventionelle Synthese erlaubt die spektroskopische Charakterisierung der Partialsequenzen und deren Einbeziehung in die biophysikalischen Untersuchungen.

Diese Argumente für die klassische Peptidsynthese rechtfertigen den mit ihr verbundenen hohen Zeit- und Arbeitsaufwand.

In der Sequenz des Eicosapeptids erkennt man zwei Schnittstellen, durch die das Peptid in drei Partialsequenzen unterteilt wird:

Asn-Arg-Arg¦Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln¦(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$

In Richtung C-Terminus sind dies ein hydrophiles Tripeptid-, ein lipophiles Heptapeptid- und ein stark lipophiles Dekapeptidfragment, die jeweils separat zu synthetisieren und durch Fragmentkupplung zum Zielpeptid zu vereinigen wären.

Im Heptapeptidfragment würde sich jedoch ein Glutaminrest in C-terminaler Position befinden. Bei der Verknüpfung mit dem Dekapeptidfragment bestünde unter den Kupplungsbedingungen der DCC-Methode für Gln die Gefahr von Nebenreaktonen (Cyclisierung, Nitrilbildung, Racemisierung). Auch die Heranziehung anderer Kupplungsverfahren garantierte angesichts der Anfälligkeit des C-terminalen Glutamins für Nebenreaktionen keinen Syntheseerfolg, zumal für die Verknüpfung zweier relativ großer Fragmente energischere Reaktionsbedingungen erforderlich sind.

Eine alternative Strategie, die diese Schwierigkeiten umgeht, bietet sich in der Verlegung der Schnittstelle an: Glutamin wird mit dem Dekapeptidfragment zum Undekapeptid gekuppelt, so daß die nachfolgende Segmentkondensation mit dem Hexapeptid wegen des nun C-terminalen Glutamins in der Aminokomponente ohne Gefahr von Nebenreaktionen oder Racemisierung durchgeführt werden kann.

Die Unterteilung der Eicosapeptid-Sequenz sieht nun folgendermaßen aus:

Asn-Arg-Arg ⋮ Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala ⋮ Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$

Tripeptid	Hexapeptid	Undekapeptid
Segment A	Segment B	Segment C

Diese Synthesestrategie berücksichtigt gleichzeitig das Problem der Reinigung. Der niedermolekulare Reaktionspartner, im vorliegenden Fall stets die Carboxykomponente, wird im Überschuß eingesetzt. Nicht abreagiertes Ausgangsmaterial kann dann nach beendeter Reaktion samt den anderen kupplungsbedingten Beiprodukten vom Reaktionsprodukt mittels Gelchromatographie an Sephadex abgetrennt werden.
Abb. 2.1.1 zeigt das Syntheseschema des Eicosapeptids.

2.2. Auswahl der Kupplungsmethoden

Die Synthese des Eicosapeptids verlangte vor allem möglichst racemisierungsfreie Kupplungsschritte und gute Ausbeuten. Außerdem war wegen vorauszusehender Löslichkeitsschwierigkeiten der höheren Peptide die Verwendung von Dimethylformamid in Betracht zu ziehen.

Mit dem DCC/HOBt-Kupplungsverfahren (48-50)

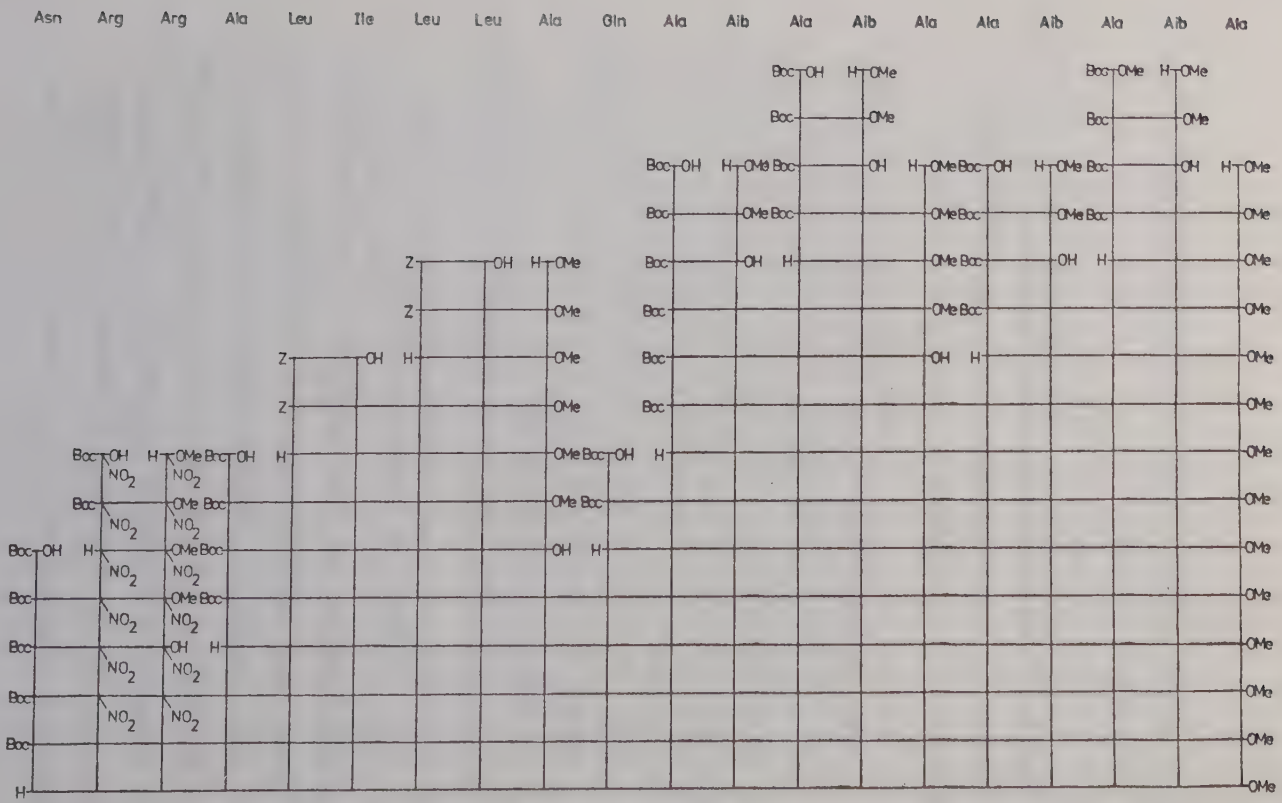


Abb. 2.1.1: Syntheseschema des Eicosapeptids

wurde die Forderung nach Anwendbarkeit von DMF als Reaktionsmedium sowie weitgehender Unterdrückung der Racemisierung und Dehydratisierung der Amidgruppe während der Kupplung erfüllt. Dies galt auch für Fälle, in denen zur Erzielung optimaler Ausbeuten bei Verknüpfung größerer Peptidfragmente statt unter anfänglicher Kühlung des Reaktionsansatzes auf -10°C gleich bei höheren Temperaturen oder sogar Raumtemperatur gekuppelt werden mußte. Die bei einer solchen Modifizierung der Arbeitsvorschrift entstandenen D-Anteile der Aminosäuren hielten sich in einem für die vorgesehene Verwendung des Peptids vertretbaren Rahmen.

Die bei diesem Verfahren im Reaktionsansatz vorhandenen niedermolekularen Verbindungen 1-Hydroxybezotriazol, Dicyclohexylharnstoff und N-Methylmorpholinium-hydrochlorid konnten üblicherweise durch Ausschütteln oder, nach Darstellung der höheren Peptide (Deka-, Undeka-, Heptadeka-, Eicosapeptid) durch Gelchromatographie an Sephadex LH 20 abgetrennt werden.

Das Pentapeptid Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH wurde nach der von Oekonomopulos (46) beschriebenen Strategie aufgebaut. Analog hierzu wurde für die Synthese von Boc-Ala-Aib-OMe aus Boc-Ala-OH und H-Aib-OMe x HCl die gemischte Anhydridmethode mit Chlorameisensäureisobutylester (48, 51-54) verwendet.

2.3. Reinigungsmethoden und Schutzgruppentaktik

Alle niedermolekularen Fragmente einschließlich des Hexapeptids Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe konnten im Rahmen der vorgeschriebenen Aufarbeitung durch Ausschütteln und Umkristallisieren in befriedigender Reinheit dargestellt werden. Die höheren Fragmente vom Dekapeptid an und das geschützte Eicosapeptid wurde durch Gelchromatographie an Sephadex LH 20 in Chloroform/Methanol (1:1) gereinigt.

Für den Schutz der N- und C-Termini wurde fast durchweg die bewährte Kombination Boc/OMe verwendet. Eine Ausnahme bildeten die Peptide Z-Leu-Leu-Ala-OMe und Z-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe, die durch Hydrierung an Pd/Aktivkohle in Methanol-Eisessigmischungen entacyliert wurden (55).

Die Abspaltung der Boc-Gruppe konnte in 1.2 N HCl/Eisessig durchgeführt werden. Nur das Dipeptid Boc-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe wurde wegen auftretender Nebenreaktionen in Trifluoressigsäure/Dichlormethan (1:1) demaskiert.

Die Methylester konnten glatt in methanolischer Lösung mit 1 N NaOH verseift werden.

Im Fall der Argininreste erwies sich die Schutzgruppenwahl als problematisch. Da wegen der Gefahr von Nebenreaktionen an den freien Guanidinofunktionen deren

Demaskierung erst nach dem letzten Kupplungsschritt in Frage kommt, ist eine schonende Abspaltungsreaktion erforderlich. Hier bot sich die hydrogenolytisch entfernbare N_g-Nitrogruppe (56) an. Dabei mußte jedoch der Nachteil in Kauf genommen werden, daß die Hydrierung einer N_g-Nitrogruppe innerhalb eines größeren Peptidverbandes nicht ohne weiteres quantitativ abläuft. So gelang bei dem Eicosapeptid die vollständige Freisetzung der Guanidinogruppen erst nach längerer Hydrierdauer und genau dosierter Zugabe von HCl.

2.4. Darstellung der Segmente A - C

Alle Kupplungsreaktionen wurden dünnschichtchromatographisch in den Systemen II (sauer), III (alkalisch) und IV (neutral) verfolgt. Als Referenzsubstanzen wurden jeweils die beiden Reaktionskomponenten, HOBt und DCH aufgetragen. Detektiert wurde mit Ninhydrin, anschließend mit Chlor/TDM.

2.4.1. Synthese von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH
(Tripeptid, Segment A)

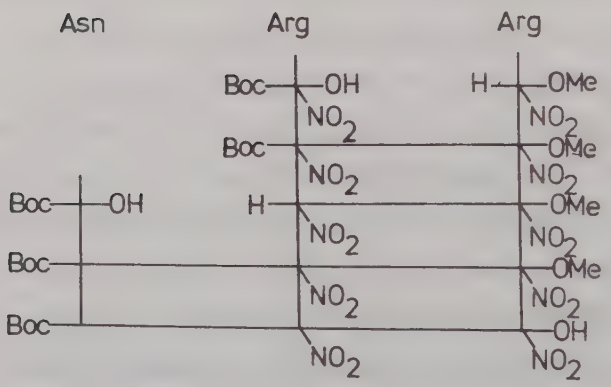


Abb. 2.4.1.1: Syntheseschema des Segments A

Der Aufbau dieses hydrophilen Tripeptids erfolgte auf die in der Diplomarbeit (55) beschriebene Weise. Beim geschützten Tripeptidmethylester erübrigten sich längere Reinigungsoperationen, da er in der Kälte aus methanolischer Lösung in hoher Reinheit ausfiel.

Die Überführung in die Tripeptidsäure gelang unter den üblichen Verseifungsbedingungen.
Um die Gefahr von Nebenreaktionen (57) zu umgehen, wurde der Verlauf der Verseifung sorgfältig durch

Dünnschichtchromatographie verfolgt und die Reaktion nach vollständigem Umsatz sofort abgebrochen.

2.4.2. Synthese von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OH (Hexapeptid, Segment B)

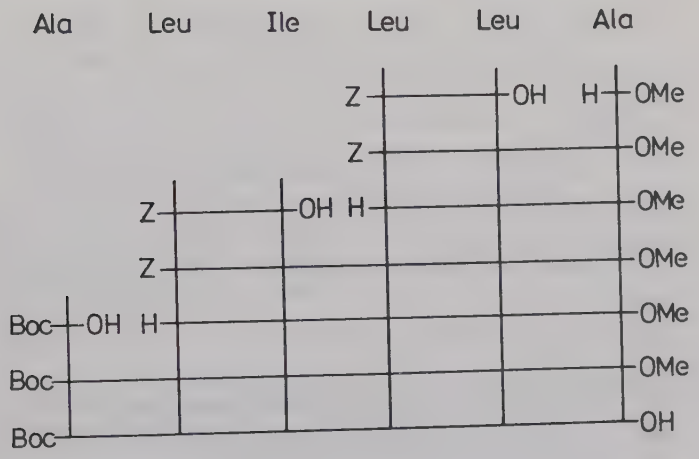


Abb. 2.4.2.1: Syntheseschema des Segments B

Das Hexapeptid wurde in Anlehnung an die in der Diplomarbeit beschriebene Synthese dargestellt (55).

Die zwei Kupplungsschritte zum Aufbau des Pentapeptids Z-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe konnten der

Löslichkeitseigenschaften der Kupplungskomponenten wegen in Dichlormethan durchgeführt werden. Der geschützte und freie Pentapeptidmethylester war dagegen schlecht löslich, so daß die Hydrierung in Methanol mit hoher Konzentration an Eisessig und die anschließende Kupplung zum Hexapeptid in DMF erfolgen mußte.
Die Spaltung des Hexapeptidmethylesters gelang in methanolischer Suspension durch Zugabe von 2 Äquivalenten 1 N NaOH. Nach 20 - 30 min bildete sich eine klare Lösung. Die Verseifung war nach 2 h quantitativ und lieferte nach üblicher Aufarbeitung die dünnschichtchromatographisch reine Hexapeptidsäure.

2.4.3. Synthese von Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Undekapeptid, Segment C)

Das Pentapeptid Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe wurde in der von Oekonomopulos (46) beschriebenen Weise (Aufbau von Boc-Ala-Aib-OMe nach der Mischanhydrid-Methode) synthetisiert. Die Menge des Pentapeptidmethylersters wurde halbiert; die eine Charge wurde durch Verseifung in die Pentapeptidsäure überführt, die andere mittels 1.2 N HCl/Eisessig entacyliert.

Zur anschließenden Fragmentkupplung wurden die beiden reinen, gut getrockneten Reaktionskomponenten im Molverhältnis 1:1 eingesetzt. Durch die nach beendeter Kupplung durchgeführte Gelchromatographie an Sephadex LH 20 in Chloroform/Methanol (1:1) konnten die Spuren nicht umgesetzten Ausgangsmaterials vom Produkt abgetrennt werden.

Nach Freisetzung der Aminogruppe durch 1.2 N HCl/Eisessig gelang glatt die Kupplung zum Undekapeptid. Dabei wurde Boc-Gln-OH in 1.5 fachem Überschuß eingesetzt um eine optimale Ausbeute zu erzielen. Das Undekapeptid war ohne Schwierigkeiten von Resten an Boc-Gln-OH, HOBt, DCH und Morpholiniumsalz gelchromatographisch abzutrennen und wurde dünnschichtchromatographisch rein erhalten.

Eine weitere Methode zur Synthesekontrolle stellt neben den üblichen Analysen und spektroskopischen Verfahren die FAB-Massenspektrometrie dar (FAB = fast atom bombardment). Bei dieser Methode wird die Probe in einem geeigneten Lösungsmittel auf die Emitteroberfläche gebracht und mit ionisierten Xenonatomen beschossen.

Von dem entacylierten Deka- und Undekapeptidmethylester konnten FAB-Massenspektren aufgenommen werden (Abb. 2.4.3.2 und 2.4.3.3).[+] Sie bestätigen in ein-

---

[+]Herrn H. Bartholomä, Tübingen, danke ich für die Aufnahme der FAB-Massenspektren.

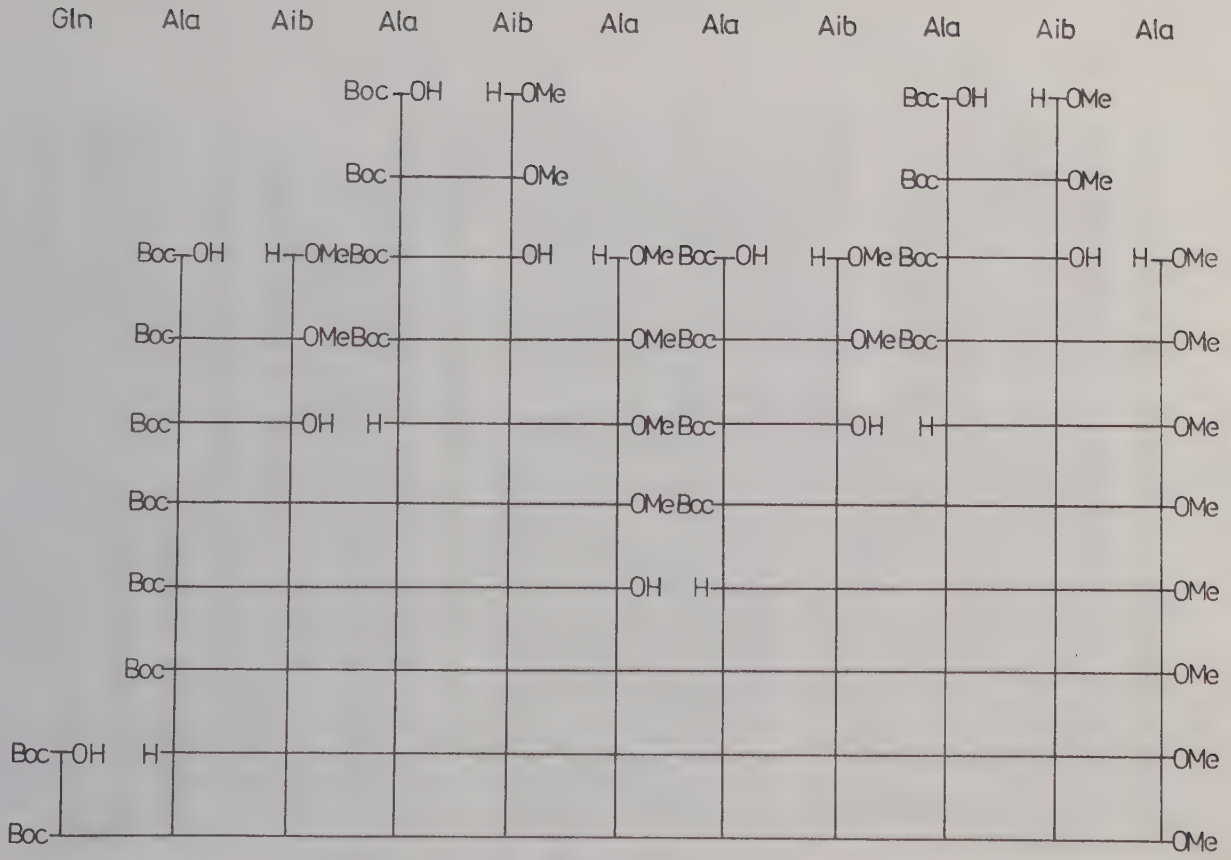


Abb. 2.4.3.1: Syntheseschema des Undekapeptid-Segments

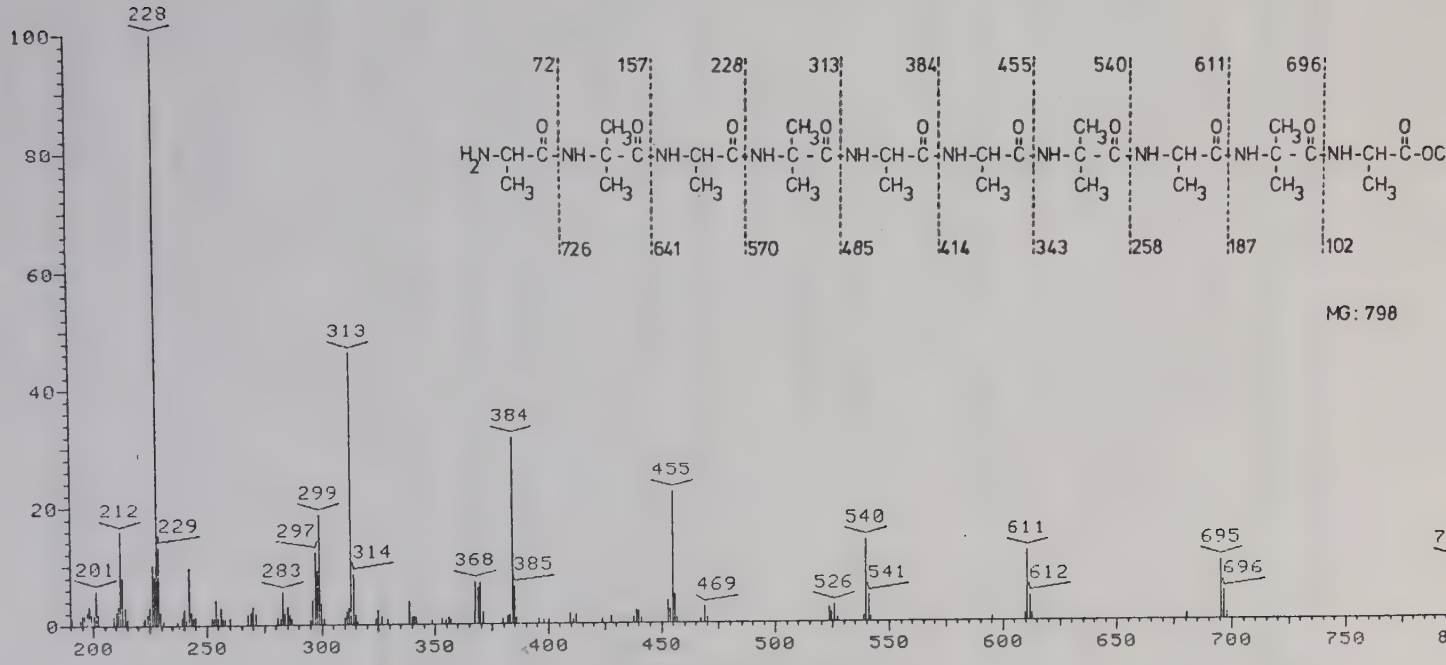


Abb. 2.4.3.2: FAB-Massenspektrum des Dekapeptids

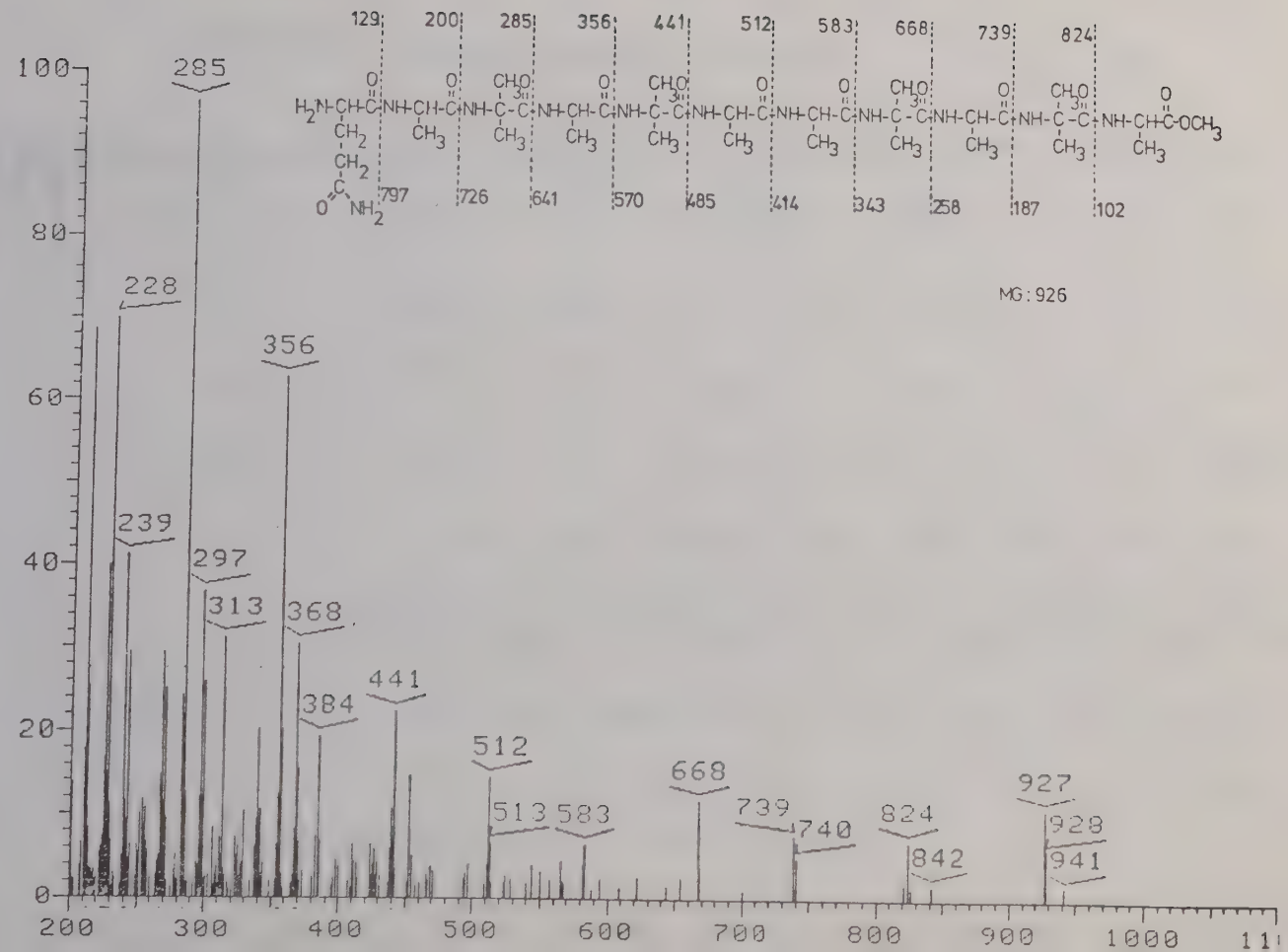


Abb. 2.4.3.3: FAB-Massenspektrum des Undekapeptids

drucksvoller Weise die Identität der gemessenen Verbindungen mit den Partialsequenzen. Man erkennt deutlich als wahrscheinlichste Bruchstelle im Molekül die Peptidbindung. Es treten dadurch alternierende Massendifferenzen von 71 und 85 auf, die jeweils Ala und Aib entsprechen. Die Massenzahl von 228 kommt durch das Fragment H-Ala-Aib-Ala- zustande, für das es im Dekapeptid drei und im Undekapeptid vier Realisierungsmöglichkeiten gibt.

2.5. Synthese von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Heptadekapeptid)

Die Kupplung zum Heptadekapeptid erfolgte ohne Kühlung des Reaktionsansatzes und wurde erst nach 64 h abgebrochen. Die Hexapeptidsäure (Carboxykomponente) wurde in 1.25 fachem Überschuß zugegeben. Durch diese Maßnahmen wurde eine für Fragmente dieser Größe befriedigende Ausbeute von 57% erzielt. Die Reinigung dieses lipophilen Peptids gelang gelchromatographisch an Sephadex LH 20 in Chloroform/Methanol (1:1).

2.6. Synthese von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (geschütztes Eicosapeptid)

Die wegen des kleineren Tripeptids günstigere Kinetik dieser Kupplung erforderte nur eine Reaktionsdauer von 48 h, und die Löslichkeiten der Peptide erlaubten eine anfängliche Kühlung des Ansatzes auf -5°C. Diese schonenden Bedingungen erwiesen sich wegen der Empfindlichkeit der hydrophilen Tripeptid-Komponente als sinnvoll. Sie wurde in 2.5 fachem Überschuß eingesetzt. Die Aufarbeitung und Reinigung erfolgte wie zuvor beschrieben.

Das Löslichkeitsverhalten des schon stark amphiphilen geschützten Eicosapeptids wird von seinen ausgedehnten lipophilen Bereichen bestimmt. Es löst sich bereitwillig in Methanol oder Chloroform/Methanol (1:1).

Die analytischen (s. Abschn. 8.) und spektroskopischen Daten (Abschn. 3. und 4.) bestätigen die Identität der Verbindung mit dem Zielpeptid.

2.7. Darstellung von H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (freier Eicosapeptidester)

Bei der Demaskierung des geschützten Eicosapeptids wurden zuerst die N_g-Nitrogruppen an den Argininresten hydrogenolytisch entfernt und anschließend die Asn-N_α-Aminogruppe mit 1.2 N HCl/Eisessig freigesetzt. Diese Reihenfolge erlaubte die schonende und nahezu vollständige Isolierung des N_g-entschützten Boc-Eicosapeptids aus dem Reaktionsansatz der Hydrierung, da nach beendeter Hydrogenolyse das Peptid trotz zweier permanenter positiver Ladungen in Lösung blieb und auch nicht merklich vom Pd/Aktivkohlekatalysator adsorbiert wurde.

Die nachfolgende Abspaltung der Boc-Gruppe in 1.2 N HCl/Eisessig änderte die Löslichkeitseigenschaften des Peptids in drastischer Weise. Die Löslichkeit wurde nun gänzlich von dem extrem hydrophilen N-Terminus bestimmt. Es konnten z.B. verdünnte, klare wäßrige Lösungen des freien Eicosapeptidesters hergestellt werden.

Die Aminosäurenanalyse (Abschn. 8.2) und die gaschromatographische Bestimmung der Aminosäure-D-Anteile (Abb. 2.7.1) bestätigten den Syntheseerfolg.

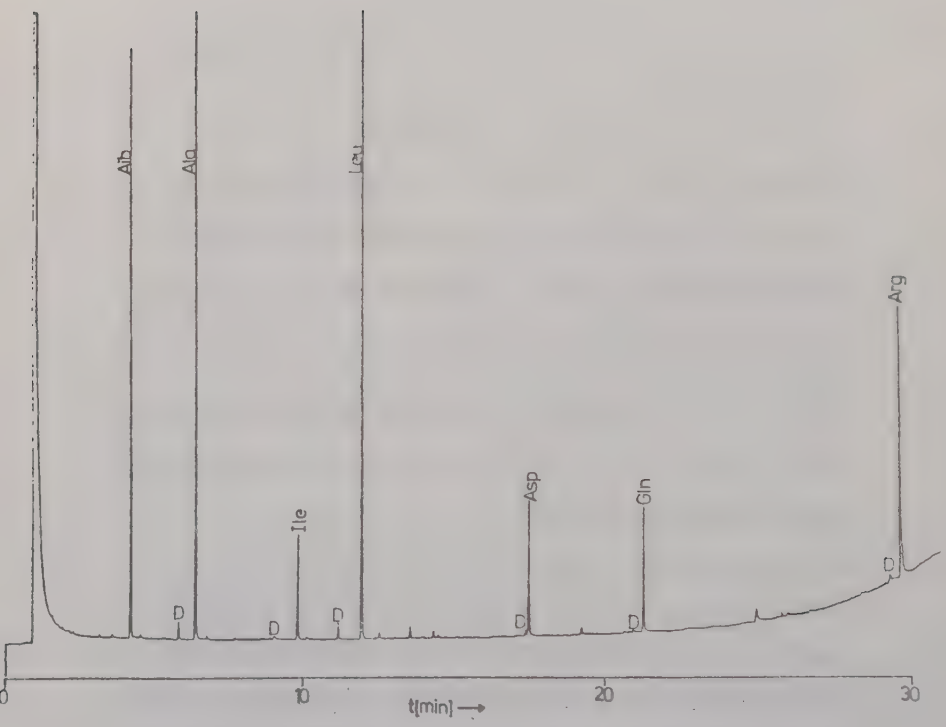


Abb. 2.7.1: Gaschromatogramm der Pentafluorpropionyl-aminosäure-n-propylester eines Hydrolysats (18 h) des freien Eicosapeptidesters zur quantitativen Bestimmung der D-Aminosäurenanteile an einer Glaskapillarsäule mit Chirasil-Val.

3. ^{13}C-NMR-SPEKTROSKOPIE

Die ^{13}C-NMR-spektroskopische Untersuchung der N-geschützten Peptidderivate diente beim Aufbau des Eicosapeptids vor allem als Synthesekontrolle. Darüber hinaus boten die Spektren die Möglichkeit, ergänzend zu CD-Untersuchungen qualitative Aussagen über wahrscheinliche Konformationsanteile der Peptide in Lösung zu erhalten. Solche Informationen lassen sich z.B. aus der Aufspaltung der Aib-C_β-Signale ableiten. Dabei wird die Tatsache ausgenützt, daß die α-Methylgruppen der α-Aminoisobuttersäure in einer fixierten Anordnung aufgrund ihrer asymmetrischen Umgebung magnetisch nicht äquivalent sind.

Wie bei der Konformationsaufklärung der Polypeptidantibiotika Alamethicin (29), Suzukacillin (58) und Trichotoxin (7) sowie verschiedener Modellpeptide (59-61) gefunden wurde, weist eine große magnetische Nichtäquivalenz der Aib-Methylgruppen auf eine starre Konformation hin. Die größten Aufspaltungen von 4 bis zu 5 ppm wie sie auch in dem kürzlich synthetisierten Alamethicin F 30 beobachtet wurde (15), findet man bei Strukturen mit hohem α-helikalen Anteil. In fixierten, nicht-helikalen Konformationen spalten die Signale nur etwa halb so stark auf. Das Tripeptid Ac-Ala-Aib-Ala-OMe, das eine durch Röntgenstrukturanalyse (62) bewiesene β-turn-ähnliche Struktur be-

sitzt, weist eine magnetische Nichtäquivalenz von 2.6 ppm auf. Freier bewegliche Aib-Di- und Tripeptide zeigen nur eine geringe oder gar keine Aufspaltung.

Die meisten Peptide konnten in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/$^{12}C,^{2}H$-Methanol (1:1) vermessen werden, dem Lösungsmittelgemisch, das die Herstellung stabiler konzentrierter Lösungen erlaubt. Dadurch erübrigte sich eine Berücksichtigung der Lösungsmittelabhängigkeit, und die Spektren konnten direkt miteinander verglichen werden.+

3.1. Spektrum von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe (Tripeptid, Segment A)

Das Spektrum wurde aus Gründen der Löslichkeit in ^{2}H-Dimethylsulfoxid aufgenommen (Abb. 3.1.1). Die Signale lassen sich problemlos zuordnen und liegen bei den erwarteten Werten (Tab. 3.1.1).
Es überrascht, daß die $C\alpha$-Region aus nur einem Peak besteht, der offenbar 4 Signale enthält (Asn-$C\alpha$, 2x Arg-$C\alpha$, OCH_3).

+Den Herren R. Bretthauer, B. Maier, U. Siehl und K.-P. Voges danke ich für die Aufnahme der Spektren.

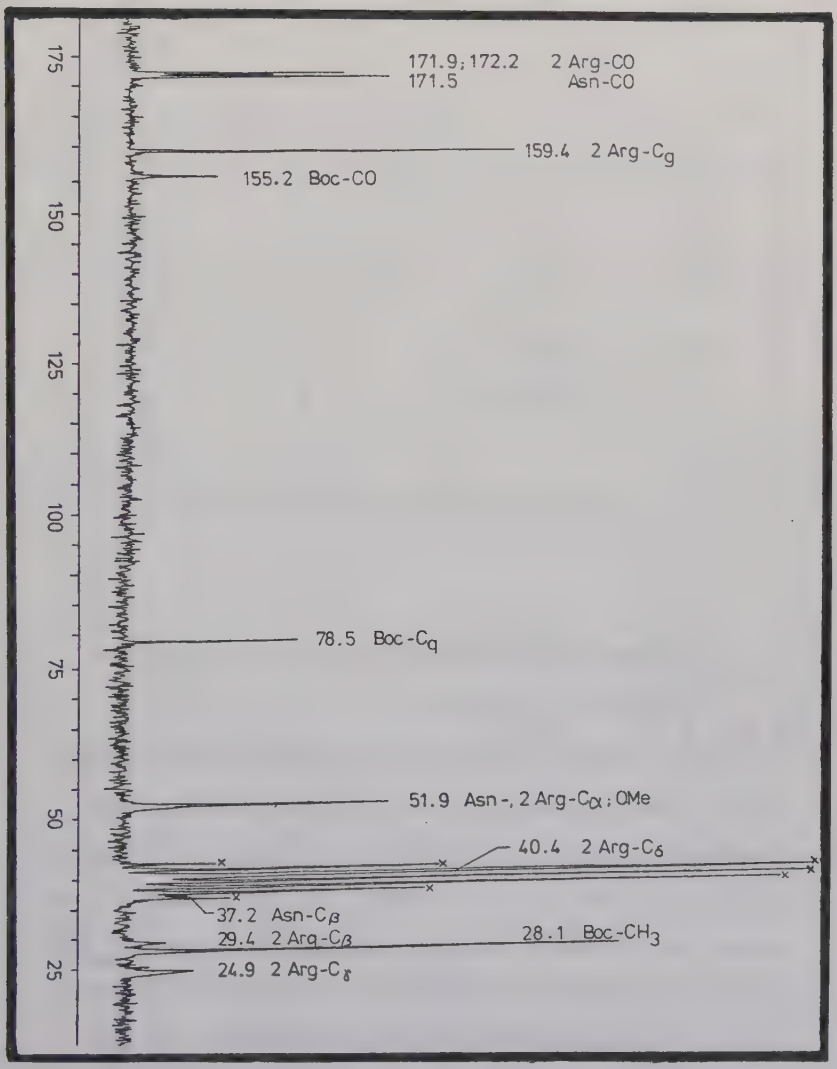


Abb. 3.1.1: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe in ^{2}H-DMSO

Tab. 3.1.1: ^{13}C-NMR-Daten des Tripeptid-Segments A in ^{2}H-DMSO

	CO	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_ε
Asn	171.5	51.9	37.2			
Arg	171.9 172.2	51.9(2x)	29.4(2x)	24.9(2x)	40.4(2x)	159.4
Boc	155.2	C_q:78.5 CH_3:28.1				
OMe-CH_3: 51.9						

3.2. Spektrum von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe (Hexapeptid, Segment B)

Im Carbonylbereich des Spektrums (Abb. 3.2.1) erkennt man in einem schmalen Bereich von nur 2.4 ppm sechs CO-Signale, wobei je 2 Signale mit doppelter Intensität vorliegen. Die C_α-Signale bei 49.0 und 51.5 ppm gehören zu C- und N-terminalem Alanin. Das um 2.5 ppm tieffeldverschobene N-terminale Ala-C_α liefert einen Hinweis auf eine relativ starre Anordnung, bei der dieser Alaninrest innerhalb einer durch H-Brücken fixierten Konformation liegt.

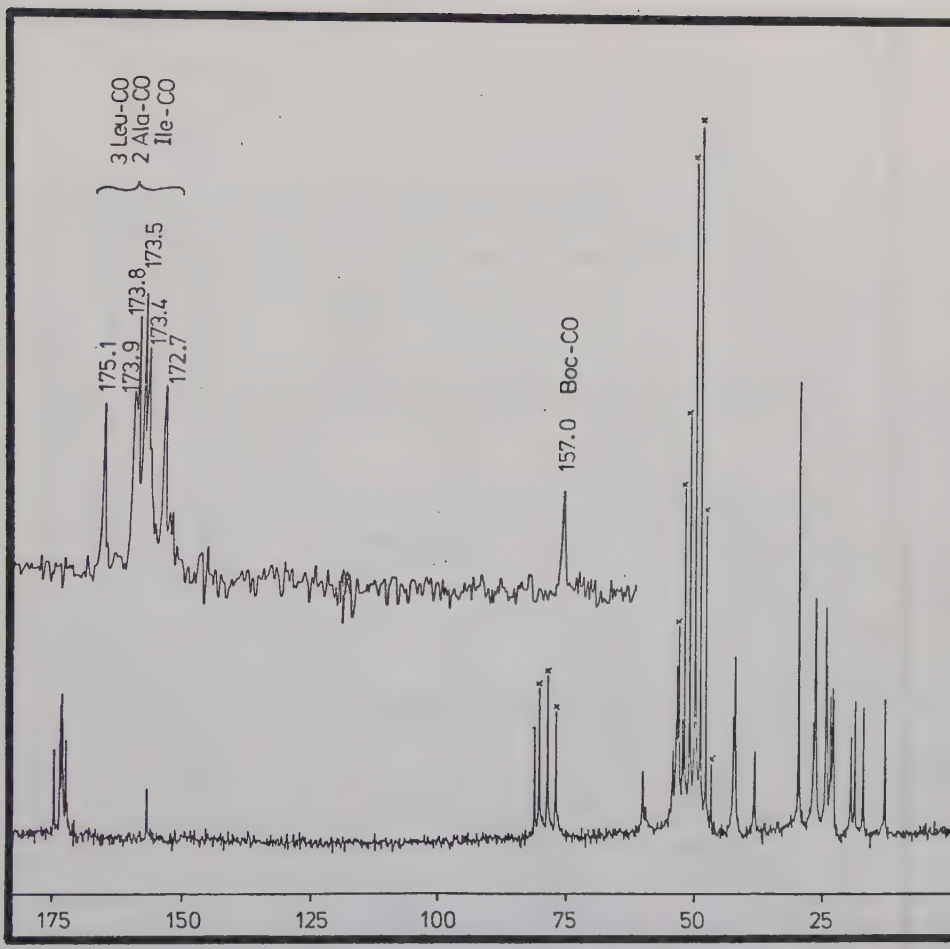


Abb. 3.2.1: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe in ^{2}H-Chloroform/^{2}H-Methanol (1:1)

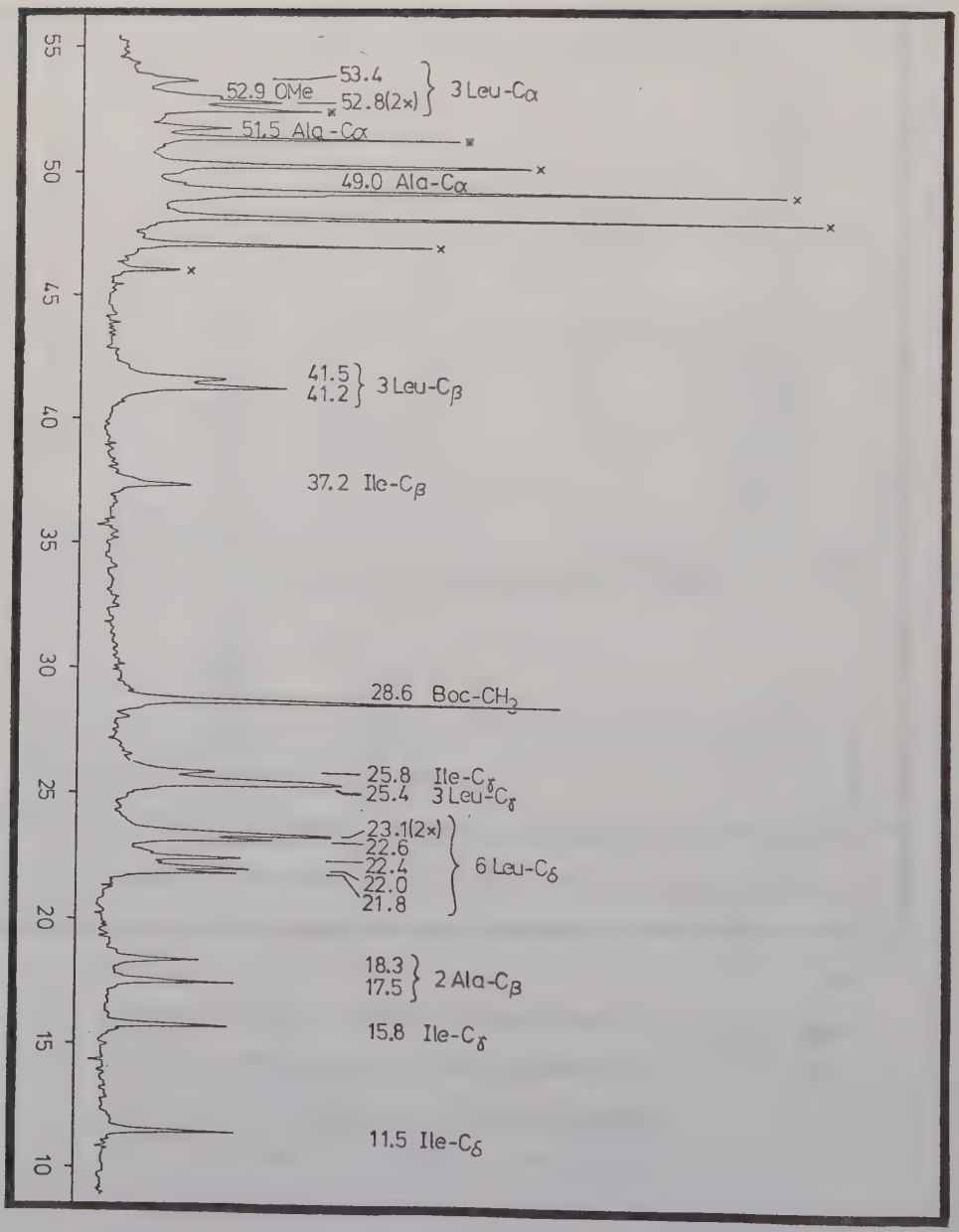


Abb. 3.2.2: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.2.1 gezeigten Gesamtspektrum

Tab. 3.2.1: ^{13}C-NMR-Daten des Hexapeptids

	CO	C_α	C_β	C_γ	C_δ	CH_3
Ala	172.7 - 175.1	49.0 51.5	17.5 18.3			
Ile		59.3	37.2	15.8 25.8	11.5	
Leu		52.8 52.9 53.4	41.2(2x) 41.5	25.4(3x)	21.8 21.9 22.1 23.2 23.3(2x)	
Boc	154.2	C_q:80.7				28.6
OMe						52.5

Ein aus diesen ^{13}C-NMR- sowie CD-spektroskopischen Daten abzuleitender Konformationsvorschlag für das Hexapeptid wäre eine durch drei H-Brücken stabilisierte Windung einer α-Helix. Als weiteres Indiz für eine solche Anordnung sind die Leu-$C\alpha$-Signallagen aufzufassen. Sie befinden sich bei 52.8, 52.9

und 53.4 ppm und sind gegenüber dem Tripeptid Z-Leu-Leu-Ala-OMe (55) um 0.5 bis 1 ppm nach fiefem Feld verschoben.

3.3. Spektren von Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH, Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Dekapeptid) und Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Undekapeptid, Segment C)

Das Spektrum der Pentapeptidsäure in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/$^{12}C,^{2}H$-Methanol (1:1) zeigt die erwarteten Signale (Abb. 3.3.1 und Tab. 3.3.1). Insgesamt sind die Signallagen gegenüber dem von Oekonomopulos in Methanol aufgenommenen Spektrum des Pentapeptidmethylesters (46) um 0.2 bis 0.4 ppm, teilweise bis zu 0.9 ppm nach tiefem Feld verschoben.

Die magnetische Nichtäquivalenz des Pentapeptidmethylesters beträgt 0.5 ppm, während die Aib-C_β-Signale der Pentapeptidsäure um 1.2 ppm aufspalten. Diese mehr als doppelt so große Nichtäquivalenz der Aib-Methylgruppen ist jedoch nicht allein auf die unterschiedlichen Lösungsmittel zurückzuführen; vielmehr muß man eine Beteiligung der freien Carboxyfunktion an einer Wasserstoffbrückenbindung und damit die Ausbildung einer Helixwindung annehmen. Die Ala-C_α-Signallagen bestätigen diese Vorstellung. Auf die Signale des C-

terminalen Ala-Cα bei 49.5 ppm und des N-terminalen bei 51.3 ppm folgt das stark tieffeldverschobene Ala-Cα-Signal des mittleren Alaninrests bei 53.0 ppm, das auf eine im Vergleich zum Methylester stärker fixierte Anordnung der Pentapeptidsäure hinweist. Die entsprechenden ppm-Werte der Ala-Cα des Pentapeptidmethylesters betragen 49.3, 51.3 und 52.2 ppm.

Das Dekapeptid besitzt bereits signifikanten α-Helixanteil (Abb. 3.3.2 und 3.3.3, Tab. 3.3.2). Die Aufspaltung der Aib-Cβ-Signale liegt mit 3.6 ppm fast in der Größenordnung des α-helikalen Alamethicins ($\Delta\delta$ = 4.2 ppm). Auch die für diese Konformation typischen Tieffeldlagen der Ala-Cα-Resonanzen sind im Spektrum zu beobachten. Das C- und N-terminale Ala-Cα erscheinen bei 50.8 und 52.5 ppm. Unter der Annahme, daß sich die Flexibilität der Peptidkette umgekehrt proportional zur Tieffeldverschiebung der Ala-Cα-Signale verhält, ergibt sich folgende Zuordnung: Ala-$C\alpha^3$: 53.3 ppm, Ala-$C\alpha^5$ und Ala-$C\alpha^6$: 53.7 und 53.6 ppm, Ala-$C\alpha^8$: 52.9 ppm. Diese Interpretation beinhaltet die Überlegung, daß die α-Helix in der Mitte starrer ist als in den terminalen Regionen, sodaß die beiden Signale bei tiefstem Feld den beiden mittleren Ala-Cα zuzuordnen sind. Eine exakte Zuordnung der

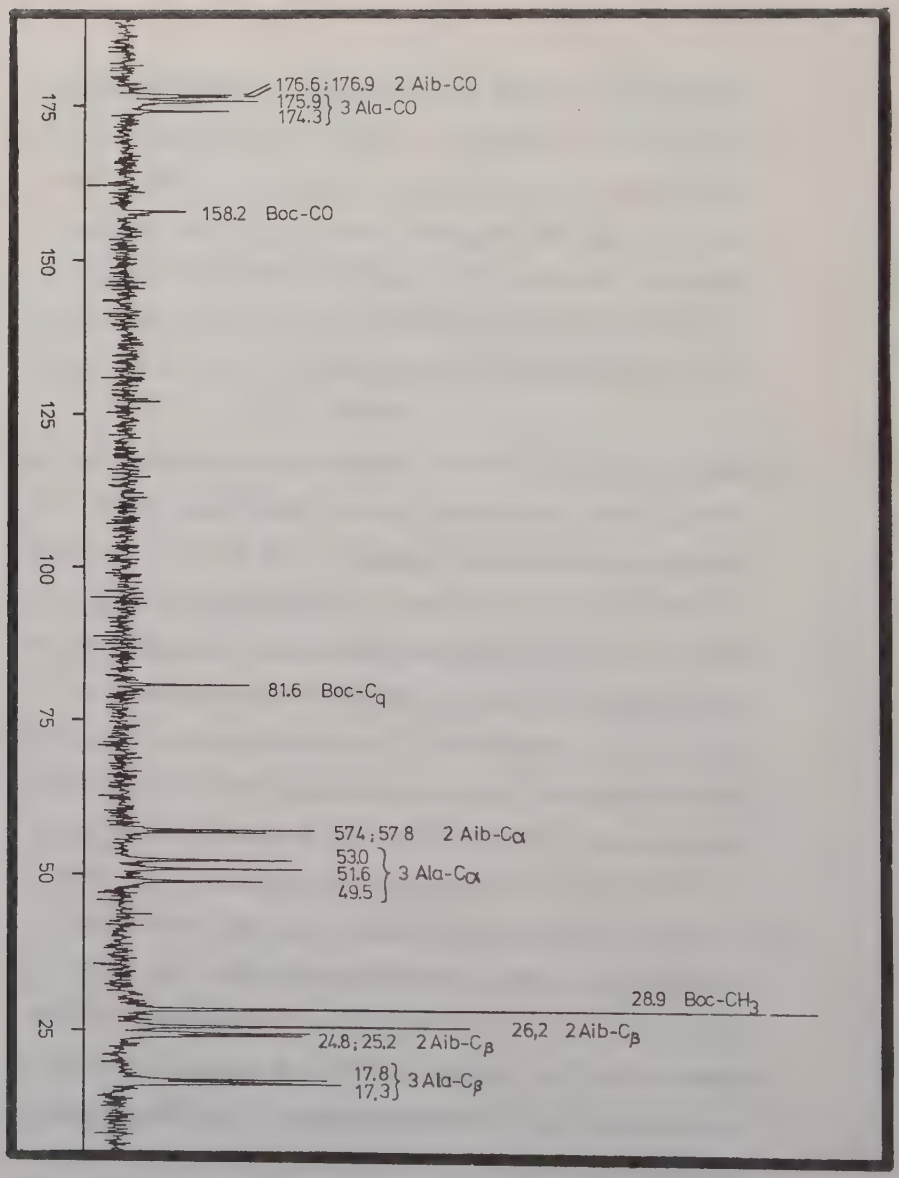


Abb. 3.3.1: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/ $^{12}C,^{2}H$-Methanol (1:1)

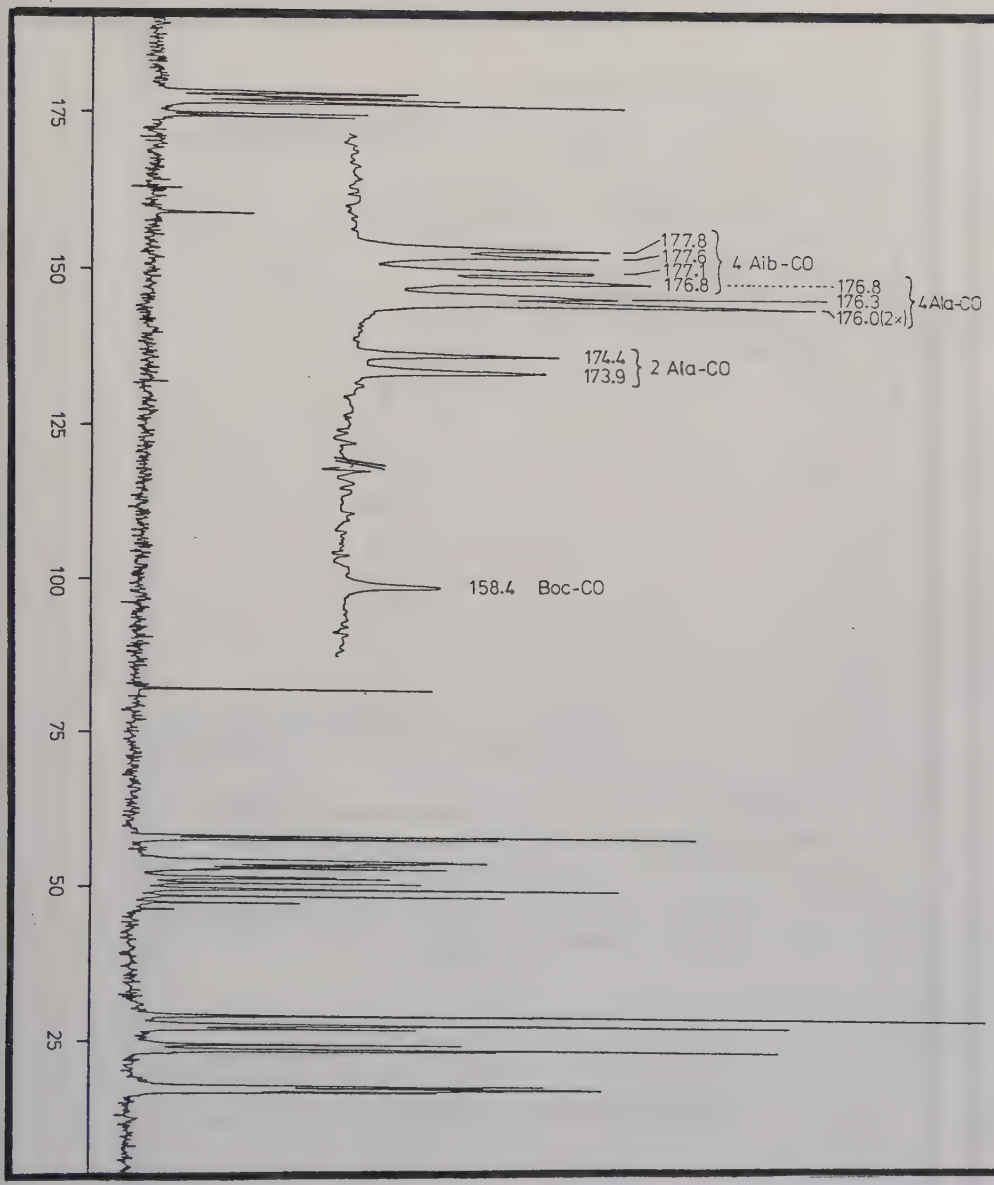


Abb. 3.3.2: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/ $^{12}C,^{2}H$-Methanol

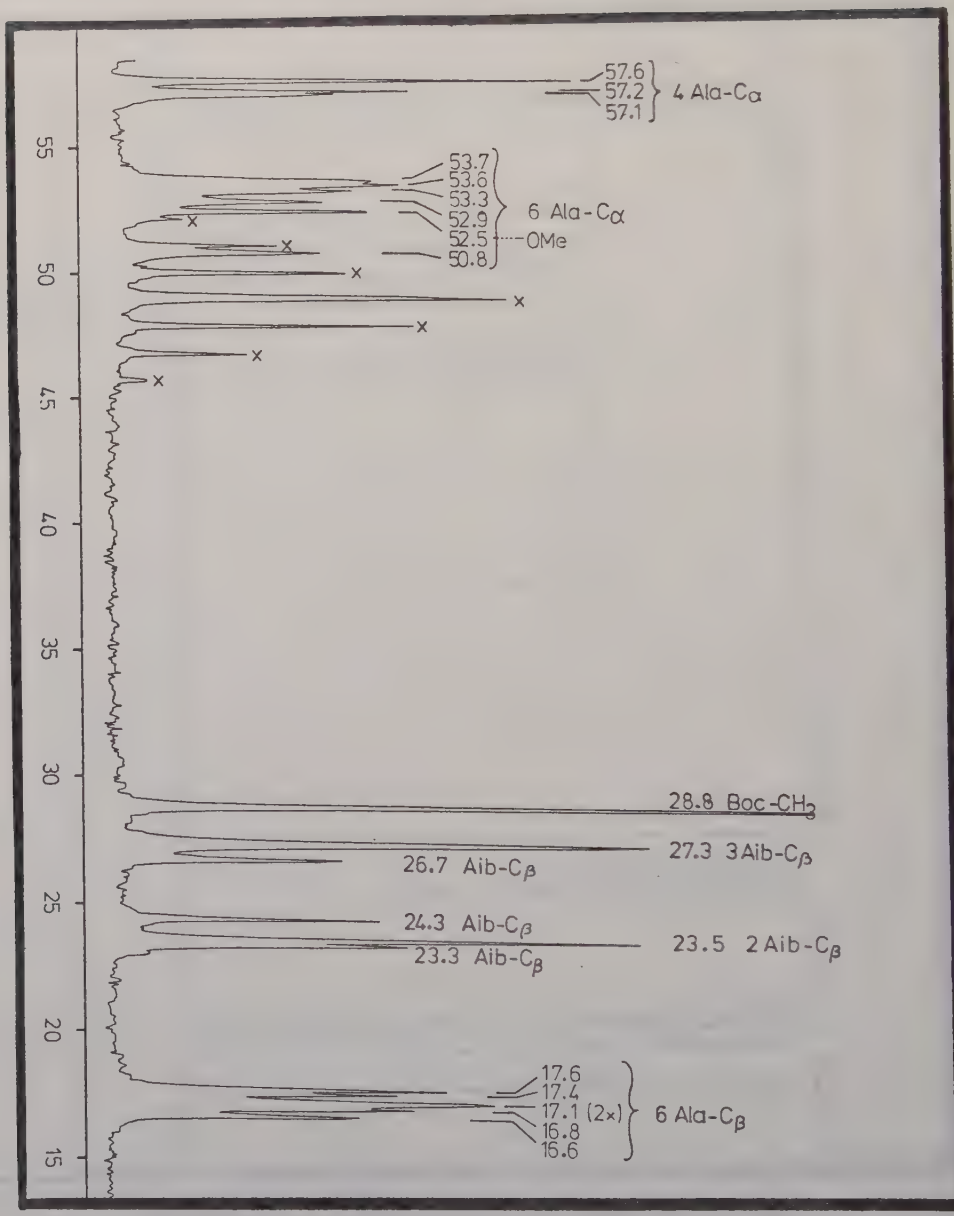


Abb. 3.3.3: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.3.2 gezeigten Gesamtspektrum

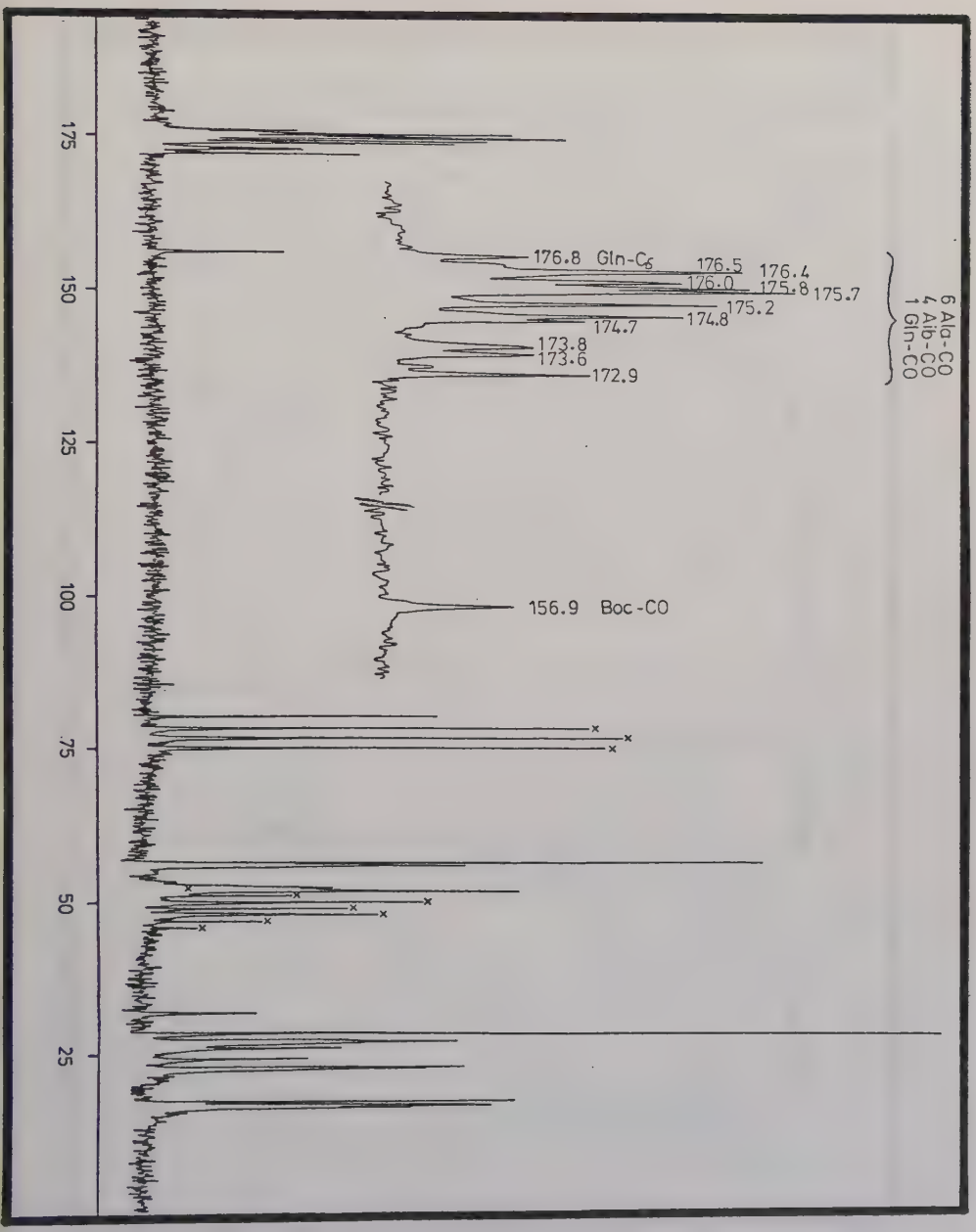


Abb. 3.3.4: ^{13}C-NMR-Spektrum (20.115 MHz) von Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe in ^{2}H-Chloroform/^{2}H-Methanol (1:1)

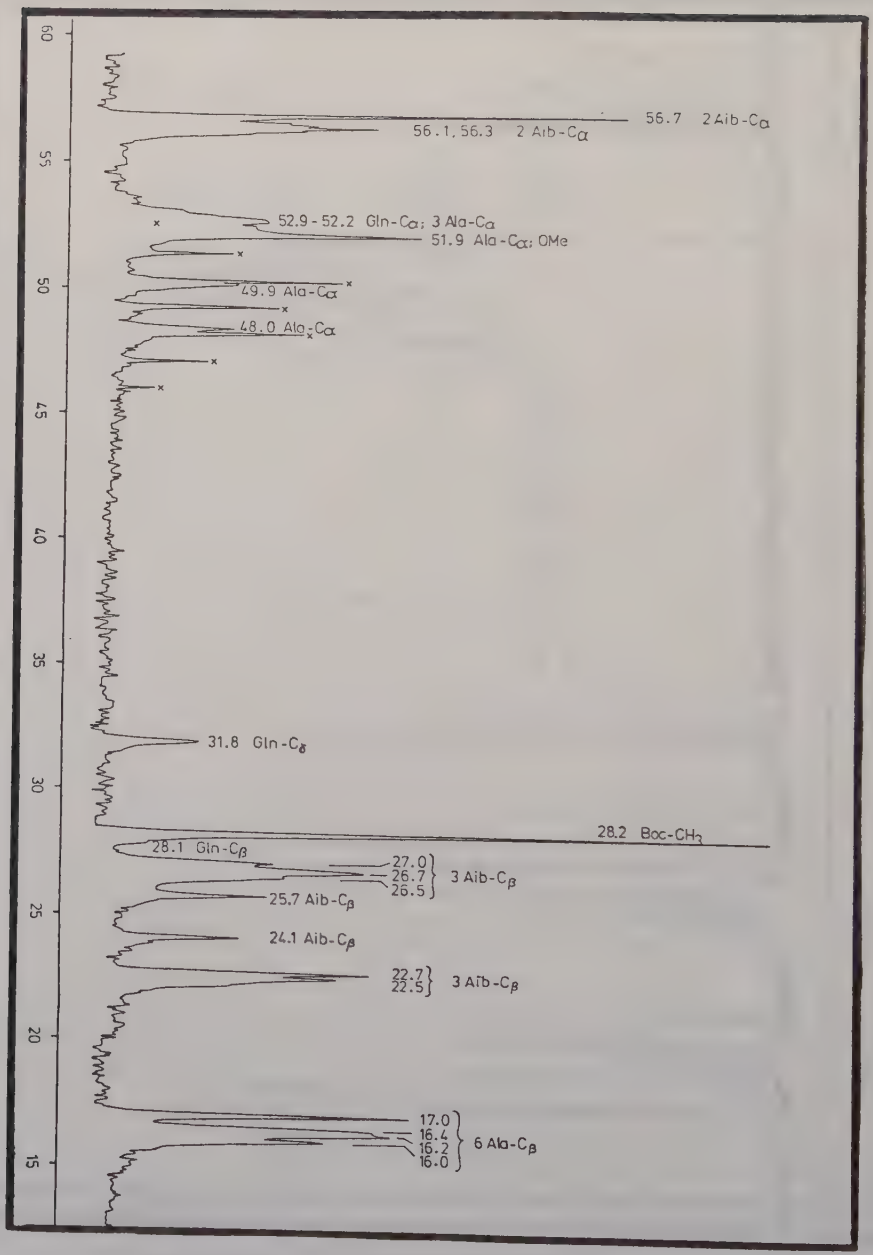


Abb. 3.3.5: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.3.4 gezeigten Gesamtspektrum

Tab. 3.3.1: ^{13}C-NMR-Daten von Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH

	CO	C_α	C_β	CH_3
Ala	174.3 175.9 (2x)	49.5 51.6 53.0	17.3 (2x) 17.8	
Aib	176.6 176.9	57.4 57.8	24.8 25.2 26.2 (2x)	
Boc	158.2	C_q: 81.6		28.9

Tab. 3.3.2: ^{13}C-NMR-Daten des Dekapeptids

	CO	C_α	C_β	CH_3
Ala	173.9 174.4 176.0(2x) 176.3 176.8	50.8 53.3 52.5 53.6 52.9 53.7	16.6 16.8 17.1(2x) 17.4 17.6	
Aib	176.8 177.1 177.6 177.8	57.1 57.2 57.6(2x)	23.3 23.5(2x) 24.3 26.7 27.3(3x)	
Boc	158.4	C_q: 81.2		28.8
OMe				52.5

Tab. 3.3.3: ^{13}C-NMR-Daten des Undekapeptids

	CO	C_α	C_β	C_γ	C_δ	CH_3
Ala	172.9 - 176.8	48.0 50.1 51.9 (2x) 52.2 52.5 (2x)	16.0 16.2 16.4 (3x) 17.0 (2x)			
Aib		56.1 56.4 56.7 (2x)	22.2 25.7 22.5 26.5 22.7 26.7 24.1 27.0			
Gln		52.9	28.1	31.8	176.8	
Boc	156.9	C_q:80.5				28.2
OMe						51.9

zwei Signale ist jedoch ohne weitere NMR-Experimente nicht möglich.

In Analogie hierzu sieht eine Identifizierung der Aib-$C\alpha$ - Resonanzen folgendermaßen aus: Aib-$C\alpha^2$: 57.2 ppm (57.1 ppm ?), Aib-$C\alpha^4$, Aib-$C\alpha^7$: 57.6 ppm und Aib-$C\alpha^9$: 57.1 ppm (57.2 ppm ?). Die beiden Aib-$C\alpha$ an Position 2 und 9 sind nicht sicher zuzuordnen.

Die Signale der übrigen C-Atome erscheinen bei den üblichen Werten.

Das Spektrum des Undekapeptids (Abb. 3.3.4 und 3.3.5) ist insgesamt um ca. 1 bis 3 ppm gegenüber dem des Dekapeptids nach hohem Feld verschoben.

Die magnetische Nichtäquivalenz der Aib-Methylgruppe erreicht den bei Alamethicin gemessenen Wert von 4.2 ppm und reflektiert den hohen α-helikalen Konformationsanteil dieses Peptids. Die Ala-C_α-Resonanzen verteilen sich auf einem Bereich von 4.5 ppm (im Dekapeptid erstrecken sie sich über 2.9 ppm). Das C-terminale Ala-C_α ist mit 48.0 ppm um 2.8 ppm und das N-terminale mit 50.1 ppm um 2.4 ppm hochfeldverschoben. Es folgen die in helikaler Region liegenden Ala-C_α mit Signalen bei 51.9 ppm (Ala-C_α^9), 52.5 ppm (Ala-C_α^7) und 52.4 ppm (Ala-C_α^4).

Die übrigen Signale erscheinen wie erwartet, jedoch um durchschnittlich 1 ppm bei höherem Feld als im Dekapeptid (Tab. 3.3.3).

Die neu hinzukommenden Resonanzen des Glutaminrestes liegen bei folgenden Werten: Gln-C_β : 28.1 ppm, Gln-C_γ : 31.8 ppm, Gln-C_α : 52.9 ppm und Gln-C_δ : 176.8 ppm.

3.4. Spektrum von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (Heptadekapeptid)

Das Spektrum des Heptadekapeptids wurde ebenfalls in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/ $^{12}C,^{2}H$-Methanol (1:1) aufgenommen (Abb. 3.4.1 und 3.4.2). Zusätzlich wurde ein Spektrum in $^{12}C,^{2}H$-DMSO gemessen (Abb. 3.4.3 bis 3.4.5).
Die erwarteten 18 CO-Signale (Messung in DMSO) erscheinen zwischen 171.4 und 176.0 ppm und erlauben, zusammen mit den anderen Signalen, die Feststellung der Identität der Verbindung mit dem Heptadekapeptid (Tab. 3.4.2).
Die Abbildungen 3.4.4 und 3.4.5 zeigen die wichtigen Ausschnitte von 10-35 ppm und 35-65 ppm.
Das Spin-Echo-Experiment gestattet die zweifelsfreie Zuordnung von Leu-C_β bei 39.9 und 40.1 ppm, von Gln-C_γ und Ile-C_γ bei 32.7 und 26.7 ppm sowie des sehr intensitätsschwachen Gln-C_β bei 30.1 ppm, das damit um 2.0 ppm bei tieferem Feld liegt als im Undekapeptid.
Die Aufspaltung der magnetisch nicht äquivalenten Aib-C_β liegt mit 4.2 ppm in der gleichen Größenordnung wie im Undekapeptid und bestätigt damit die Vorstellung einer starren α-helikalen Konformation.
In der Aib-C_β-Region fallen zwei einzelne Peaks bei 24.3 und 26.0 ppm auf, die sich auch im Spektrum des Undekapeptids finden. Dort liegen sie bei 24.1 und 25.7 ppm

Sie stammen von zwei Methylgruppen des selben Aib-Restes, die somit untereinander eine magnetische Nichtäquivalenz von nur 1.7 ppm (Heptadekapeptid) und 1.6 ppm (Undekapeptid) besitzen.
Die Zuordnung der Ala-C_α bereitet angesichts von 12 eng aufeinanderfolgenden Signalen in einem Bereich von 49.0 bis 55.2 ppm Schwierigkeiten. Die Resonanzen bei 49.0 und 51.0 ppm sind mit C- und N-terminalem Ala-C_α zu identifizieren. Spekulativ bleiben die Zuordnungen von Ala-C_α^6 (49.7 ppm), der restlichen Ala-C_α (52.3, 53.7, 54.2, 54.7 und 55.2 ppm) sowie von Leu-C_α (53.1, 53.2 ppm) und Gln-C_α (53.7 ppm) (Tab. 3.4.1).

Das in $^{12}C,^{2}H$-DMSO aufgenommene Spektrum des Heptadekapeptids zeigt bei allen Signalen eine Hochfeldverschiebung von durchschnittlich 1 ppm gegenüber der Aufnahme in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/ $^{12}C,^{2}H$-Methanol (1:1).
Wie anfangs schon erwähnt bestätigen die 18 Carbonylresonanzen die Identität der gemessenen Verbindung mit dem Heptadekapeptid.
Das Boc-CO-Signal ist bei 157.3 ppm auszumachen. Es erscheint als Doppelsignal mit einer Aufspaltung von 0.4 ppm. Eine weitere für ein solches Peptid ungewöhnliche Aufspaltung findet sich bei dem stark hochfeldverschobenen Boc-C_q-Signal (77.3/77.5 ppm). Derartige Aufspal-

tungen etwa im Sinne einer Z/E-Isomerie werden meist an Peptiden mit einer N-terminal-ständigen Boc-Pro-Gruppierung beobachtet und liegen dort für Boc-CO bei ca. 0.7 ppm (46). Das starre Pyrrolidingerüst des Prolin verursacht in diesen Boc-Pro-Peptiden die Signalverdopplung. Es ist jedoch ungeklärt, welche starre Anordnung am N-Terminus des Heptadekapeptids eine Z/E-Isomerie und damit Signalaufspaltung erzeugt. Dasselbe Phänomen taucht auf bei 31.7 ppm, dem Gln-C_δ -Signal; bei 31.6 ppm erscheint ein zweites, praktisch intensitätsgleiches Signal. Auch hier ist die Art der Fixierung zweier, bezüglich des Gln-C_δ -Atoms isomerer Anordnungen unbekannt.

Weitere Signalverdopplungen erkennt man bei Leu-C_β (39.2, 39.3, 39.4, 39.5, 39.6 und 39.7 ppm sowie im Bereich der Aib-C_β -und Leu-C_δ -Resonanzen zwischen 23.6 und 21.3 ppm. Nach 4 Aib-C_β (26.5, 3x 26.2 ppm), Ile-C_γ (25.3 ppm) und 3 Leu-C_γ (24.4, 2x 24.3 ppm) folgen in dieser Region mindestens 16 Signale; zu erwarten sind jedoch nur 12. In Unkenntnis des Aufspaltungsmusters von Aib-C_β und Leu-C_δ in DMSO muß auf eine genaue Identifizierung der Peaks verzichtet werden.

Im C_α -Bereich findet man erwartungsgemäß 17 Signale. Bei tiefstem Feld liegt Ile-C_α (59.3 ppm); es folgt eine abgegrenzte Peakgruppe aus Aib-C_α -Signalen (56.1, 55.9,

55.5 und 55.4 ppm). Zwischen 53.4 und 47.5 ppm erscheinen 11 Signale, für die folgende Zuordnung vorgeschlagen wird: Gln-Cα : 53.3 ppm, Leu-Cα : 51.9, 2x 51.8 ppm, OCH_3: 51.3 ppm, Ala-Cα : 53.4, 52.7, 51.8, 51.6, 51.2, 50.8, 49.0 (N-terminal) und 47.5 ppm (C-terminal). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß beide Spektren alle erwarteten Signale enthalten und auf einen hohen α-helikalen Konformationsanteil in beiden Lösungsmitteln hinweisen.

3.5. Spektrum von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (geschütztes Eicosapeptid)

In dem bisher verwendeten Lösungsmittelgemisch $^{12}C,^2H$-Chloroform/ $^{12}C,^2H$-Methanol (1:1) ist das geschützte Eicosapeptid wesentlich besser löslich als das durch die drei N-terminalen positiven Ladungen stark polare freie Eicosapeptid. Dieses ist zwar wasserlöslich, bildet jedoch bei Zugabe von Wasser zu der für die Aufnahme eines ^{13}C-NMR-Spektrums erforderlichen Substanzmenge eine trübe, viskose Lösung, die ein Spektrum von sehr schlechter Qualität liefert. Außerdem läßt sich das in der Chloroform-Methanol-Mischung gemessene Spektrum mit den Spektren der übrigen Peptid-Segmente ohne Berücksichtigung des Lösungsmitteleinflusses vergleichen.

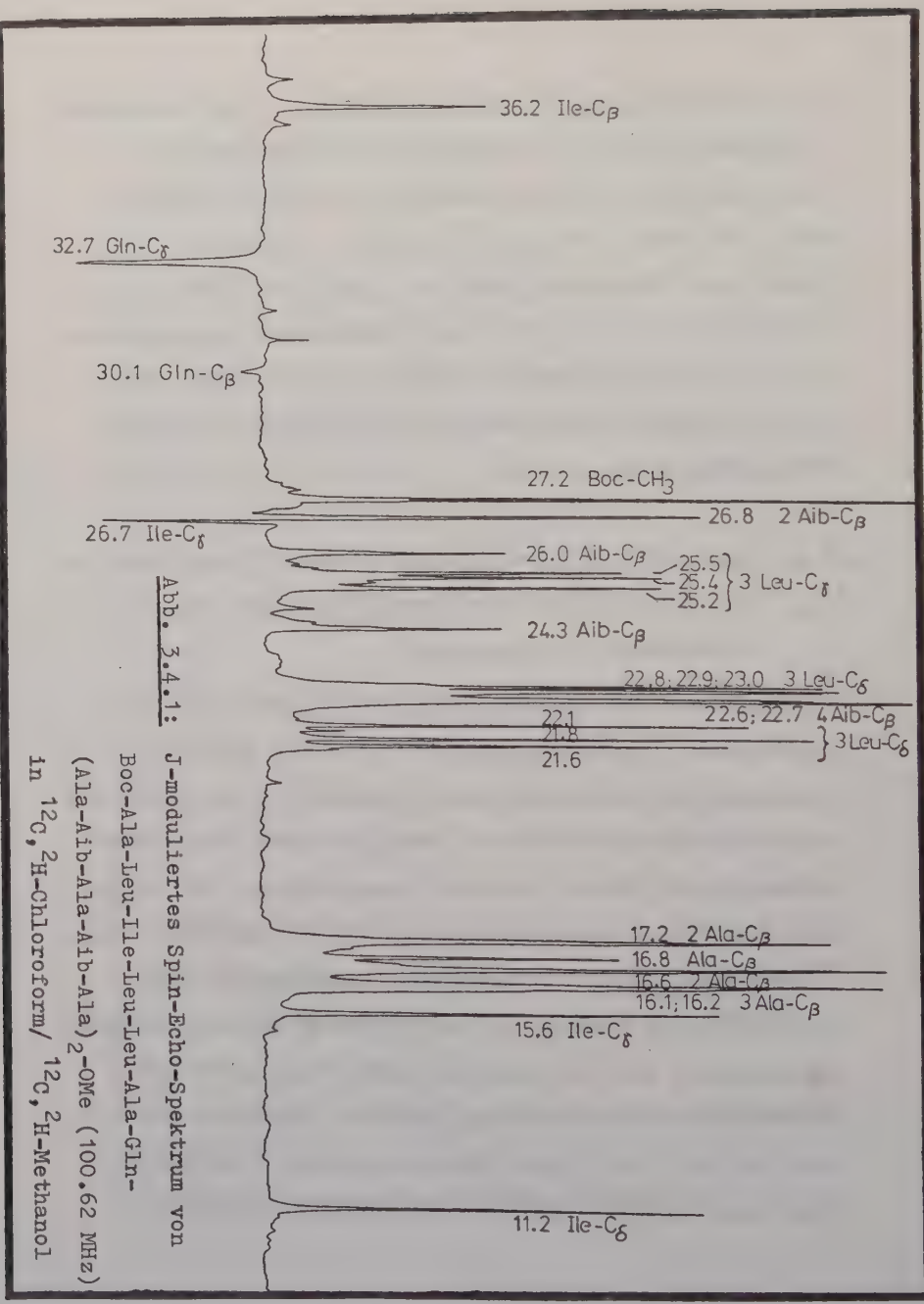


Abb. 3.4.1: J-moduliertes Spin-Echo-Spektrum von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (100,62 MHz) in ^{12}C, ^2H-Chloroform/ ^{12}C, ^2H-Methanol

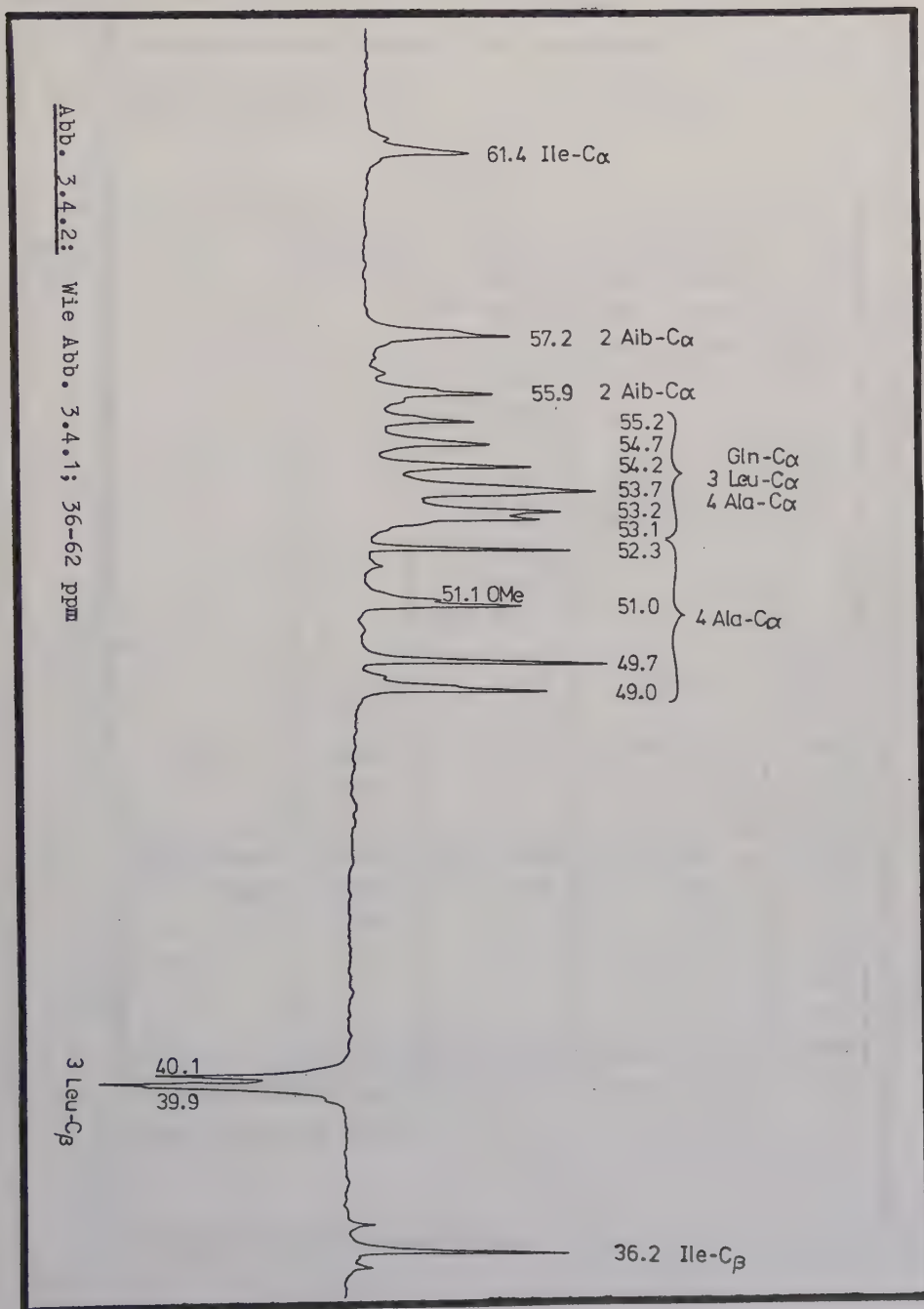
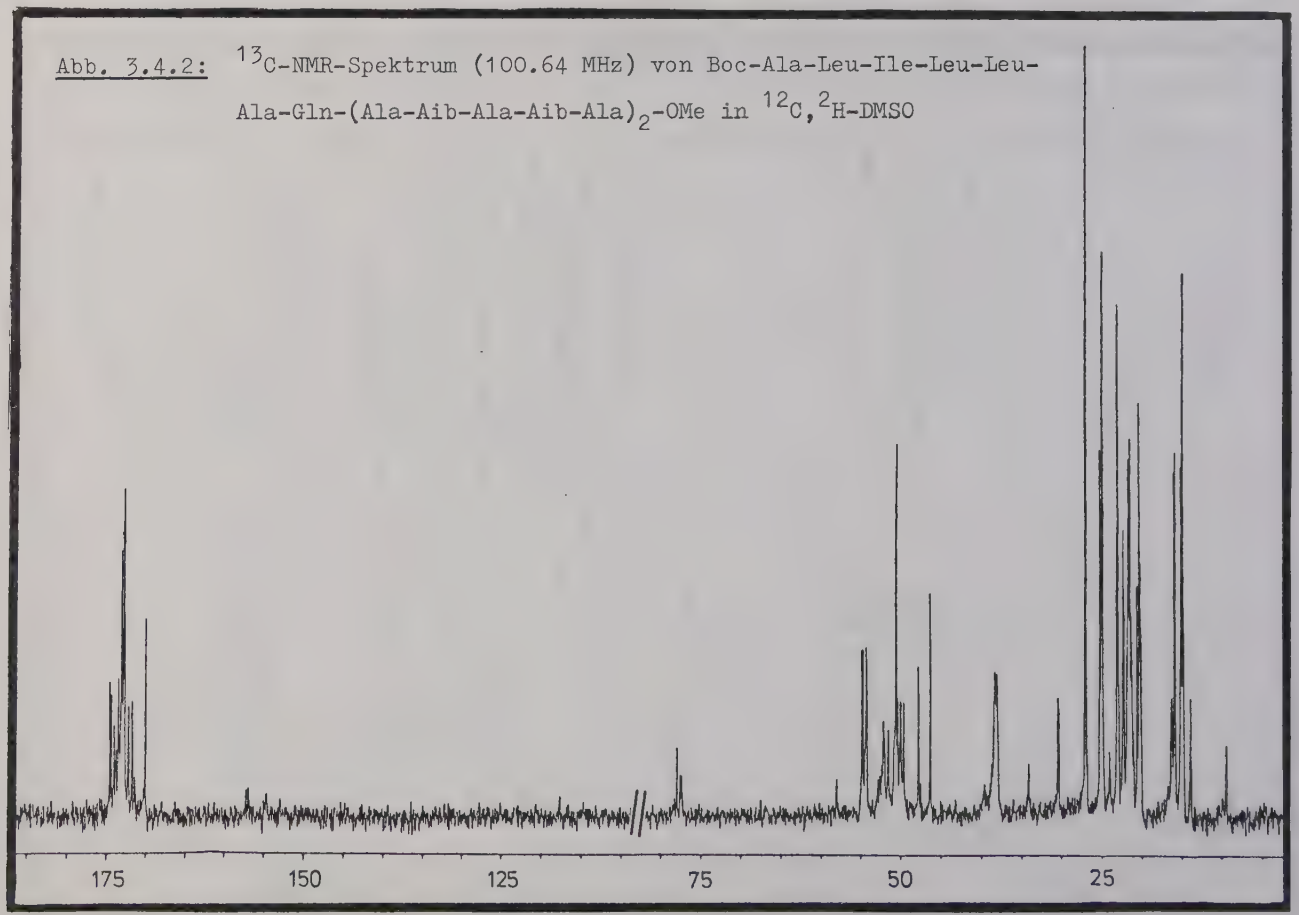


Abb. 3.4.2: Wie Abb. 3.4.1; 36-62 ppm

Tab. 3.4.1: ^{13}C-NMR-Daten des Heptadekapeptid-Segments in $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/ $^{12}C,^{2}H$-Methanol (1:1)

	C_α	C_β	C_γ	C_δ	CH_3
Ala	49.0 53.7 49.7 54.2 51.0 54.7 52.3 55.2	16.1 16.2 (3x) 16.6 (2x) 16.8 17.2 (2x)			
Aib	55.9(2x) 57.2(2x)	22.6 (4x) 22.7 24.3 26.0 26.8 (2x)			
Gln	53.7	30.1	32.7		
Ile	61.4	36.2	15.6 26.7	11.2	
Leu	53.1 (3x) 53.2	39.9 (2x) 40.1	25.2 25.4 25.5	21.6 22.8 21.8 22.9 22.1 23.0	
Boc					27.2
OMe					52.3

Abb. 3.4.2: ^{13}C-NMR-Spektrum (100.64 MHz) von Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe in ^{12}C,^{2}H-DMSO



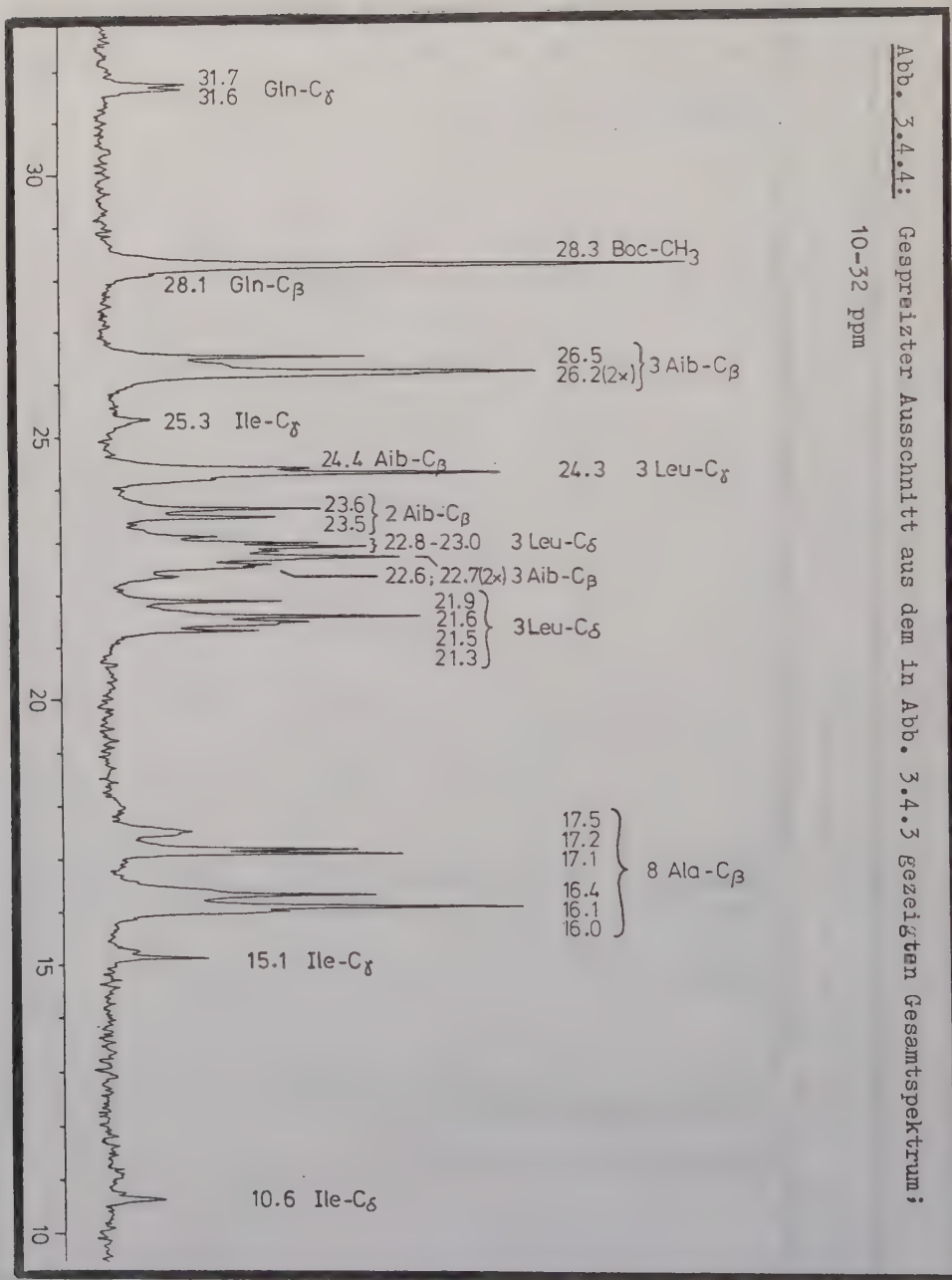


Abb. 3.4.4: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.4.3 gezeigten Gesamtspektrum; 10-32 ppm

Abb. 3.4.5: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.4.3 gezeigten Gesamtspektrum; 35-60 ppm

Tab. 3.4.2: ^{13}C-NMR-Daten des Heptadekapeptid-Segments in $^{12}C, ^{2}H$-DMSO

	CO	C_α	C_β	C_γ	C_δ	CH_3
		47.5 51.6	16.0 17.1			
Ala		49.0 51.9	16.1(2x) 17.2			
		50.8 52.7	16.4 17.5			
		51.2 53.3				
		55.4	22.6 26.2(2x)			
Aib		55.5	22.7 26.3			
		55.9	22.9 26.5			
		56.1	23.0			
Gln		53.4	28.1	31.6		
				31.7		
Ile		59.3	35.3	15.1		
				25.3		
		51.8(2x)	39.2 39.5	24.2	21.3 23.1	
		52.0	39.3 39.6	24.3	21.5 23.5	
			39.4 39.7	24.4	21.6 23.6	
Boc	156.9	C_q: 77.3				28.3
	157.3	77.5				
OMe						51.3

Das Gesamtspektrum ist in Abbildung 3.5.1, der wichtige Aliphatenbereich in den Abbildungen 3.5.2 und 3.5.3 gespreizt wiedergegeben. In Tabelle 3.5.1 ist die Zuordnung der ppm-Werte zu finden.
Das Spektrum wurde in größtmöglicher Übereinstimmung mit dem der Heptadekapeptid-Partialsequenz interpretiert und beweist wie alle anderen analytischen Daten die erfolgreiche Synthese des Eicosapeptids.

Wegen des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses in der Carbonylregion sind die theoretisch zu erwartenden 22 CO-Signale nur mit Mühe zu identifizieren. Der breite Peak, der die CO-Region auf der Seite des tiefen Feldes flankiert, besteht aus mindestens drei Signalen und stammt sehr wahrscheinlich vom polaren N-Terminus des Moleküls. Sicher ist jedoch das bei tiefstem Feld erwartete Gln-C_δ an dieser Signalgruppe beteiligt.

Boc-CO, das zwischen 156 und 158 ppm erscheinen müßte ist nicht sichtbar. Dagegen sind die beiden Arg-C_g-Signale deutlich bei 159.1 und 159.0 ppm zu sehen.

Die Zuordnung der Aib-C_β-Signale ist aus dem Aufspaltungsmuster früherer Spektren, vor allem des Heptadekapeptid-Spektrums abgeleitet. Danach erscheinen die Aib-C_β bei 25.6 (2x), 24.4, 23.7, 21.9, 21.7 und 21.6

ppm. Daraus erhält man eine magnetische Nichtäquivalenz von ca. 3.9 ppm zwischen den beiden Signalgruppen bei hohem und tiefem Feld (25.6 - 21.7 ppm).

Die C_α -Region beginnt mit dem deutlich tieffeldabgesetzten Ile-C_α (60.1 ppm); es folgen die Aib-C_α zusammen mit den neu hinzukommenden Arg-C_α zwischen 55.9 und 55.3 ppm. Nach Gln-C_α (54.6 ppm) folgen die Signale der Leu-C_α , Ala-C_α , Asn-C_α und der Ester-Methylgruppe. Auch hier tauchen wieder die üblichen Zuordnungsschwierigkeiten auf, vor allem im Bereich zwischen 52.8 und 51.3 ppm. Es erscheinen hier zum Teil breite, schlecht aufgelöste Peaks. Die meisten Ala-C_α - Signale finden sich in diesem Bereich, und die Zuordnung entbehrt,wie in den früheren Spektren nicht einer gewissen Willkür. Die folgenden drei Signale bei 50.7, 49.4 und 48.1 ppm sind eindeutig als Resonanzen derjenigen Ala-C_α zu identifizieren, die außerhalb des helikalen Bereichs liegen.

In dem Septett um 48 ppm und dem Triplett um 78 ppm werden ^{13}C-Lösungsmittelspuren durch die Akkumulation zahlreicher Interferogramme (32 768 scans) sichtbar.

Zwischen 40.7 und 38.2 ppm erscheinen Arg-C_δ , Leu-C_β und Asn-C_β , gefolgt von dem sehr intensitätsschwachen Ile-C_β .

Nach Gln-C_γ (31.9 ppm), Arg-C_β (2x 28.9 ppm) und dem

vergleichsweise intensitätsschwachen Boc-CH_3 (27.3 ppm) taucht das Gln-C_β -Signal mit einer bemerkenswerten Hochfeldverschiebung von 2.9 ppm gegenüber seiner Lage im Heptadekapeptid auf.
Arg-C_δ erscheint wie erwartet bei 26.2 und 26.1 ppm. Leu-C_δ und Ile-C_δ liegen in enger Nachbarschaft zwischen 24.3 und 24.0 ppm. Die sechs Leu-C_δ erkennt man bei 22.5 und 20.8 ppm.
Auf der Seite des hohen Feldes beschließen Ala-C_β (15.7 bis 15.0 ppm), Ile-C_γ (14.4 ppm) und Ile-C_δ (10.0 ppm) das Spektrum.

Beim Vergleich des Eicosapeptid-Spektrums mit dem des Heptadekapeptids fallen folgende Besonderheiten auf:

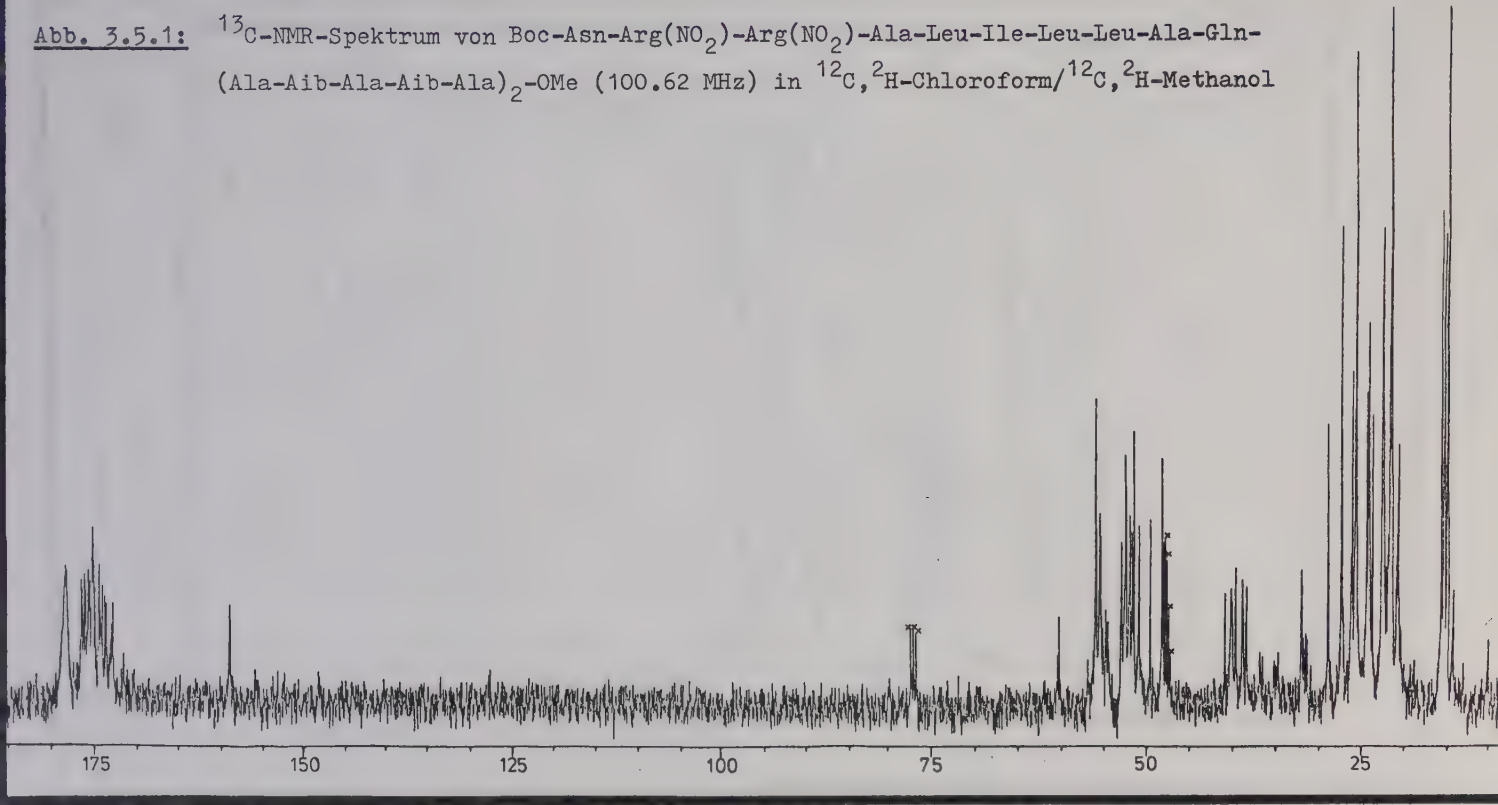
a) Alle Signallagen sind im Eicosapeptid gegenüber dem Heptadekapeptid um 1 bis 3 ppm nach hohem Feld verschoben.

b) Die magnetische Nichtäquivalenz zwischen sechs Aib-Methylgruppen ist mit 3.9 ppm etwas kleiner als im Heptadekapeptid mit 4.2 ppm. Die beiden geminalen Methylgruppen des einzelnen, vermutlich im C-terminalen Bereich sitzenden Aib-Restes spalten um 0.7 ppm auf; im Heptadekapeptid findet man eine Aufspaltung von 1.7 ppm.

Diese Befunde deuten zusammen mit den CD-spektroskopischen Daten auf eine Abnahme der α -helikalen Konfor-

mation im Eicosapeptid hin. Der polare N-Terminus bewirkt offenbar eine Störung der Helixstruktur, die sich auf das C-terminale Dekapeptidsegment jedoch relativ schwach auswirkt, wie die immer noch hohe Aufspaltung der Aib-C_β von 3.9 ppm zeigt. Somit ist dieses Segment als äußerst konformationsstabiler, lipophiler α-helikaler Anker anzusehen.

Abb. 3.5.1: ^{13}C-NMR-Spektrum von Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (100.62 MHz) in ^{12}C,^{2}H-Chloroform/^{12}C,^{2}H-Methanol



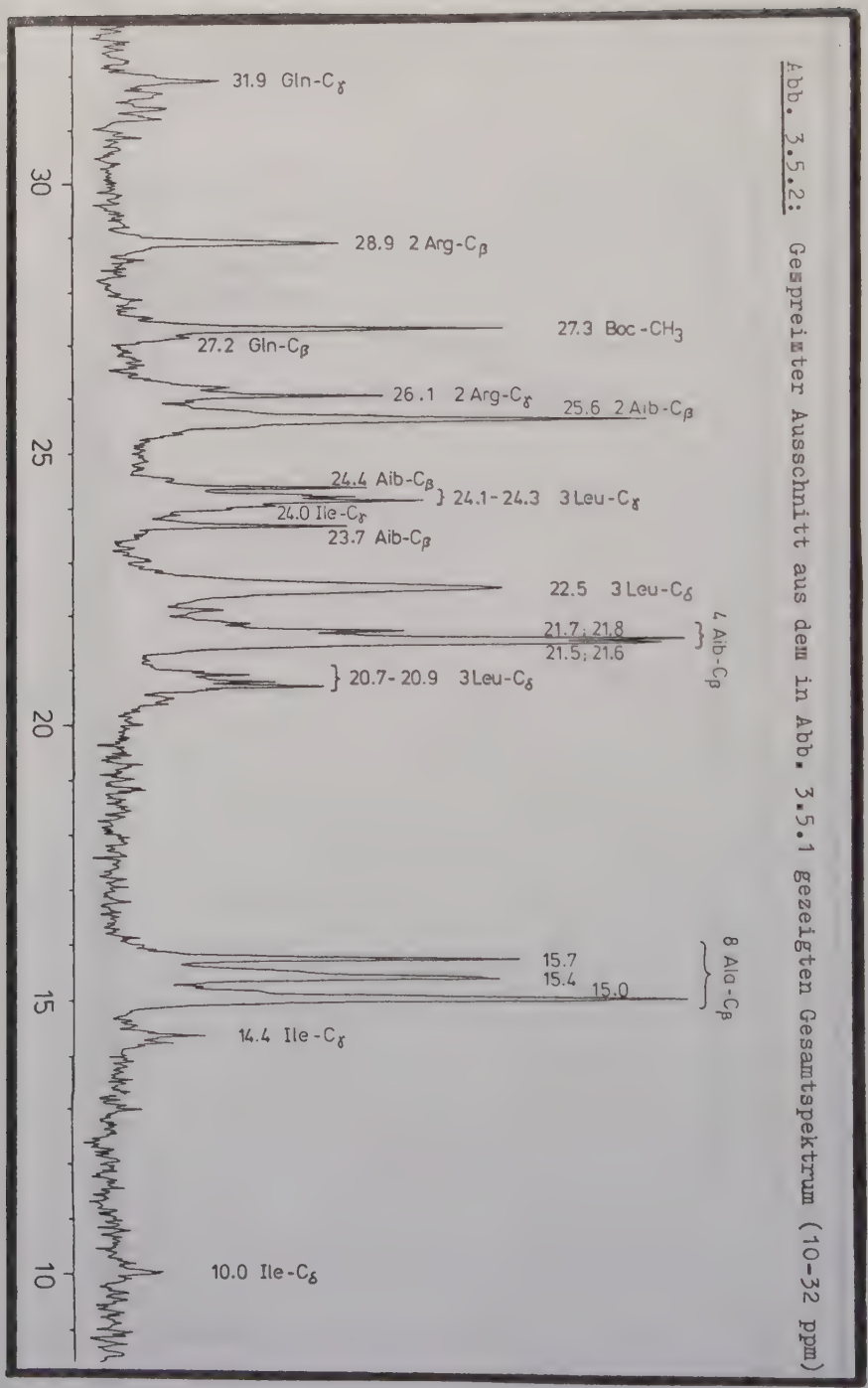


Abb. 3.5.2: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.5.1 gezeigten Gesamtspektrum (10-32 ppm)

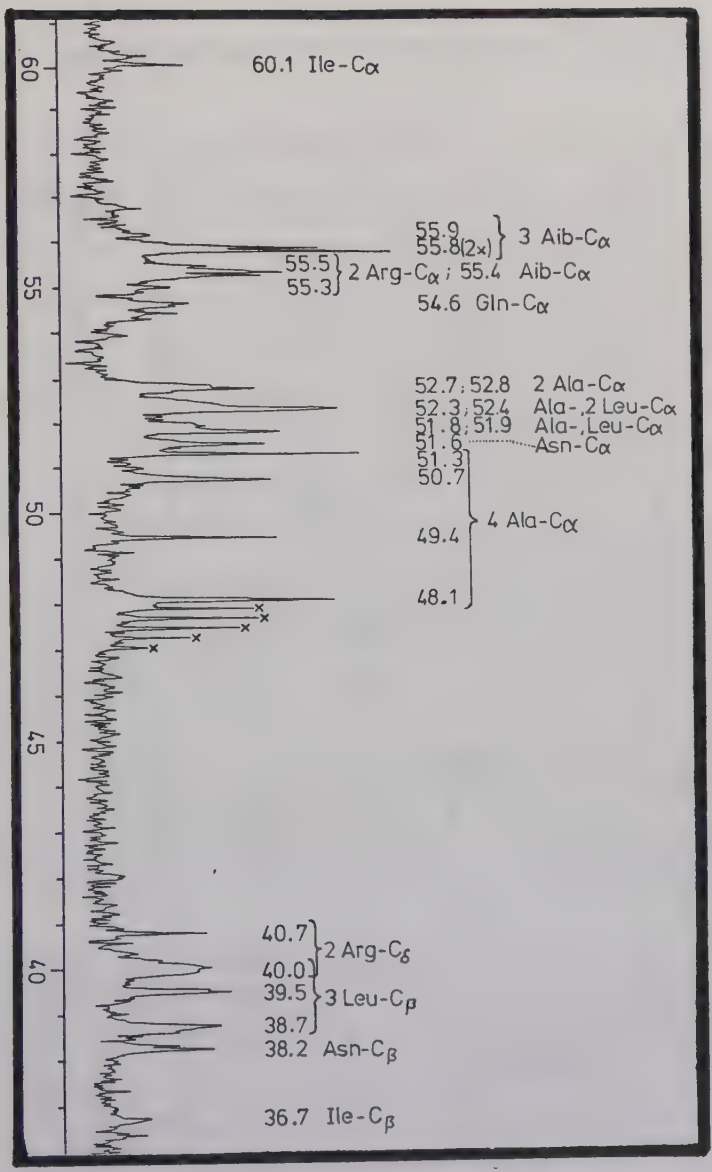


Abb. 3.5.3: Gespreizter Ausschnitt aus dem in Abb. 3.5.1 gezeigten Gesamtspektrum (36-60 ppm)

Tab. 3.5.1: ^{13}C-NMR-Daten des geschützten Eicosapeptids

	CO	C_α	C_β	C_γ	C_δ	C_ε	CH_3
Ala	172.9 - 178.9	48.1 51.9 49.4 52.3 50.7 52.7 51.8 51.3	15.0(3x) 15.4(2x) 15.7				
Aib		55.4 55.8(2x) 55.9	21.5(2x) 21.7 23.7 21.9 24.4 25.6(2x)				
Asn		51.6	38.2				
Gln		54.6	27.2	31.9			
Ile		60.1	36.7	14.4 24.0	10.0		
Leu		52.3(2x) 52.8	38.7 39.5 40.0	24.1 24.2 24.3	20.7 20.8 20.9 22.5 (2x)		
Arg		55.3 55.5	28.9	26.1 26.2	40.0 40.7	159.0 159.1	
Boc	nicht sichtbar	C_q: nicht sichtbar					27.3
OMe							51.3

4. KONFORMATIONSUNTERSUCHUNGEN

4.1. Konformationsvorhersagen

Grundlage für jede Konformationsvorhersage ist die Kenntnis der Tendenz jeder Aminosäure, bevorzugt in einer bestimmten Konformation aufzutreten.
Aus einer empirischen Datensammlung von röntgenographisch ermittelten Sekundärstrukturen von mehr als 20 Proteinen leiteten Chou und Fasman für jede Aminosäure durchschnittliche Wahrscheinlichkeiten für ihr Erscheinen in α-helikaler, β-Faltblatt- und β-turn-Konformation ab (63-66). Diese sogenannten "Potentiale" $P_{j,\xi}$ ("propensities") sind folgendermaßen definiert:

$$P_{j,\xi} := \frac{f_{j,\xi}}{\langle f_\xi \rangle}$$

wobei $f_{j,\xi} = \frac{n_{j,\xi}}{n_j}$ und $\langle f_\xi \rangle = \frac{\sum_{j=1}^{20} f_{j,\xi}}{20}$

$f_{j,\xi}$ bedeutet die Wahrscheinlichkeit, eine Aminosäure j in einer Konformation ξ anzutreffen und ist ausgedrückt durch das Verhältnis ihres Vorkommens $n_{j,\xi}$ in der Konformation ξ zu ihrem Gesamtvorkommen n_j.

$\langle f_\xi \rangle$ ist die Mittelung von $f_{j,\xi}$ über alle 20 Aminosäuren.

Die so berechneten Potentiale können Werte über oder unter 1 annehmen, die folgendermaßen zu interpretieren sind:

$P_{j,\xi} > 1$: Aminosäure j kommt mit überdurchschnittlicher Wahrscheinlichkeit in der Konformation ξ vor.

$P_{j,\xi} < 1$: Aminosäure j kommt mit unterdurchschnittlicher Wahrscheinlichkeit in der Konformation ξ vor.

$P_{j,\xi} = 1$: Aminosäure j liegt mit durchschnittlicher Wahrscheinlichkeit in der Konformation ξ vor, d.h. 50% in der Konformation ξ, 50% in random coil.

Diese Voraussagen gelten theoretisch nur für sehr lange Ketten, da sich Konformationen als kooperativer Effekt aller Aminosäuren im Proteinmolekül bilden.

Zusätzlich zu den Konformationsberechnungen wurden die Werte für Hydrophilie berechnet (67).
Die Eigenschaft der Hydrophilie eines Sequenzabschnittes ist ein Maß für dessen Tendenz, innerhalb eines Peptidverbandes eine solvensorientierte, exponierte Lage einzunehmen. Hydrophile Partialsequenzen befinden

sich stets an der Peripherie eines Proteinmoleküls und sind potentielle antigene Determinanten. Ihre Auffindung innerhalb eines Moleküls gelingt durch systematisches Absuchen der Sequenz nach hydrophilen Bereichen (68). Der jeder Aminosäure zugeordnete Hydrophiliewert (67) basiert auf Berechnungen von Solvensparametern (69). In einer Peptidkette wird der aktuelle Wert einer Aminosäure unter Berücksichtigung der fünf folgenden Aminosäuren durch Mittelung errechnet. Bei der Suche nach Epitopen auf der Proteinoberfläche liefert diese Mittelwertbildung in Sechsergruppen die zuverlässigsten Hydrophiliewerte, da die Größe einer antigenen Determinante im Durchschnitt einem Hexapeptidabschnitt entspricht.

Für die Berechnung der Hydrophilie des Eicosapeptids und der Interferonsequenz 1-35 von menschlichem Lymphoblasteninterferon HuIFN-α(Ly) wurde das von T.P. Hopp und K.R. Woods (70) in BASIC entwickelte Computerprogramm verwendet.+

Die Berechnung der Potentiale für die Konformationen α-Helix, random coil und β-turn erfolgte nach Chou und Fasman (63), ebenfalls mit Hilfe eines in BASIC geschriebenen Programms.+

Für die seltene α-Aminoisobuttersäure existieren

+Die beiden Programme wurden von C.C. Jung zusammen mit einer Hydropathievorhersage (70a) zu dem Programm HYCON 5 kombiniert.

weder Potentiale noch Hydrophiliewerte, weshalb für Aib ersatzweise Alanin eingesetzt wurde. Dabei wurde angenommen, daß der Fehler aufgrund der chemischen und strukturellen Ähnlichkeit des Alanins mit Aib nur geringfügig ins Gewicht fällt und prinzipiell die Aussagekraft der Berechnungen nicht mindert.

Es ist deutlich die Tendenz des Peptids zur Ausbildung einer α-Helix zu erkennen, vor allem in der C-terminalen Hälfte des Moleküls (Dekapeptid-Segment). Lediglich das Aminosäuretriplett Ala-Leu-Ile zeigt stärkere Tendenz zur coil- als zur Helixbildung (Abb. 4.1).
Die Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten eines β-turns liegen durchweg sehr niedrig. Somit ist aus diesen Berechnungen die Dominanz der α-Helixkonformation im Eicosapeptid klar ersichtlich.
In Übereinstimmung damit lieferte die Ermittlung der Hydrophilie mit Ausnahme der ersten beiden Aminosäuren Asn und Arg negative Werte, die für den Sequenzabschnitt Ala-Leu-Ile-Leu besonders tief absinken. In der auf Gln folgenden C-terminalen Dekapeptidsequenz weist sie konstant niedrige Werte auf. Der Kurvenverlauf spiegelt damit den amphiphilen Charakter des Moleküls wider.

Im HuIFN-α(Ly)[1-35] zeigen die Potentiale für α-Helix, random coil und β-turn im Vergleich mit dem Eicosapeptid einen fast identischen Verlauf (Abb. 4.2). Abweichungen beginnen sich erst bei den Aminosäuren 18-20 (Leu-Ala-Gln) bemerkbar zu machen: Die Wahrscheinlichkeit für α-helikale Konformation sinkt leicht ab, die Tendenz zur β-turn-Bildung nimmt zu, und die Werte für random coil bleiben praktisch gleich. Lediglich die Hydrophilie steigt etwas stärker an, da keine ausgesprochen hydrophobe Fortsetzung der Sequenz wie im synthetischen Modellpeptid gegeben ist.

Als potentielle antigene Determinante ist die hydrophile Partialsequenz 7-12, His-Ser-Leu-Gly-Asn-Arg, zu erkennen.

Insgesamt berechtigt der Vergleich des synthetischen Eicosapeptids mit der nativen Interferonsequenz hinsichtlich ihrer Konformationsvorhersagen zu der Feststellung, daß die Dekapeptid-Partialsequenz Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln innerhalb des Eicosapeptids in erster Näherung dieselbe Sekundärstruktur besitzt wie im nativen Lymphoblasteninterferon, nämlich überwiegend α-helikal.

Zusammen mit den spektroskopischen Daten unterstützen diese Berechnungen die Vorstellung, daß das Modell-

peptid über große Abschnitte, mindestens jedoch in seiner C-terminalen Hälfte als α-Helix vorliegt, wobei die drei N-terminalen polaren Aminosäuren sich nicht an der Helix beteiligen. Vielmehr ist anzunehmen, daß sie aufgrund intensiver Wechselwirkung mit Lösungsmittel in ungeordneter Konformation vorliegen.

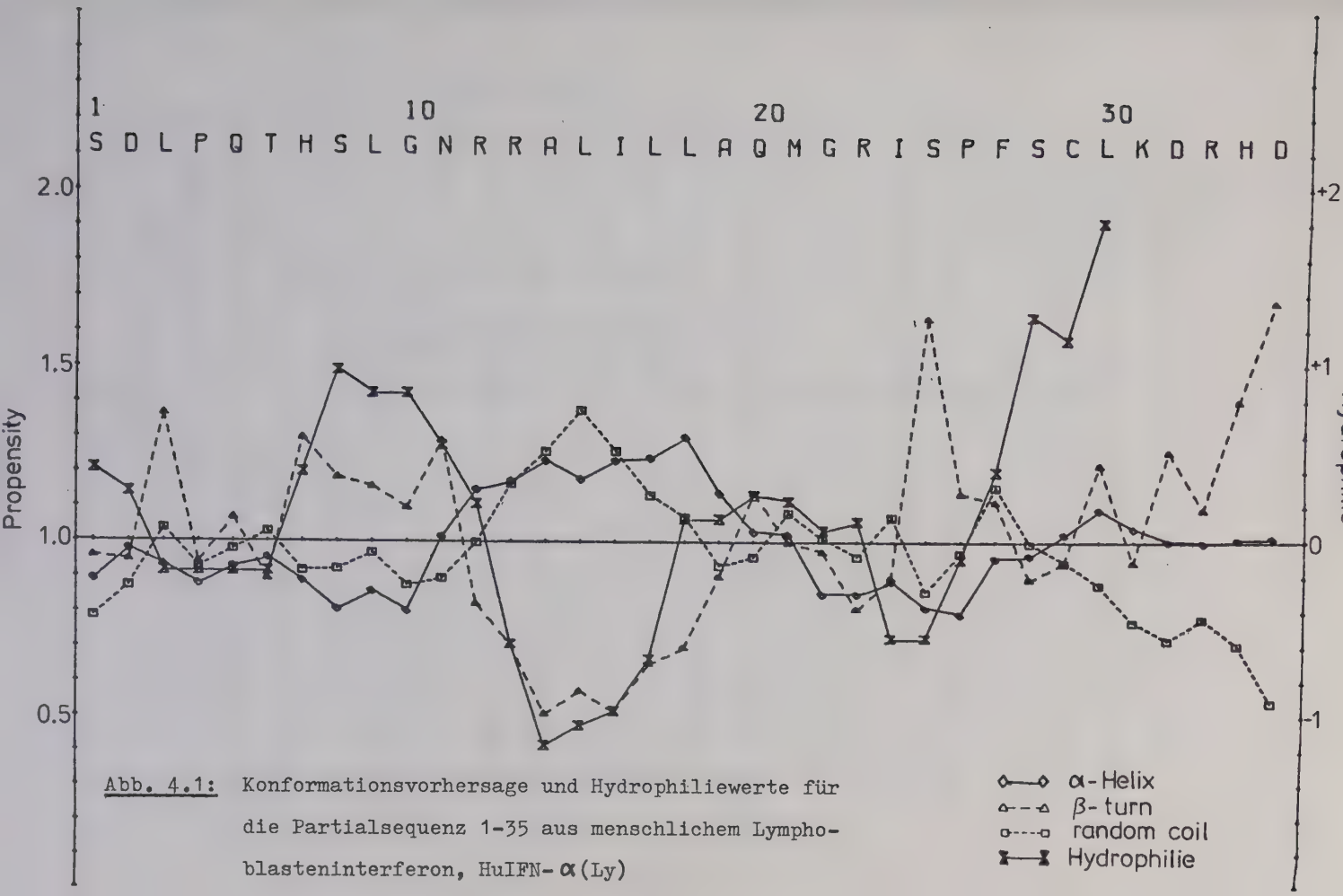


Abb. 4.1: Konformationsvorhersage und Hydrophiliewerte für die Partialsequenz 1-35 aus menschlichem Lymphoblasteninterferon, HuIFN-α(Ly)

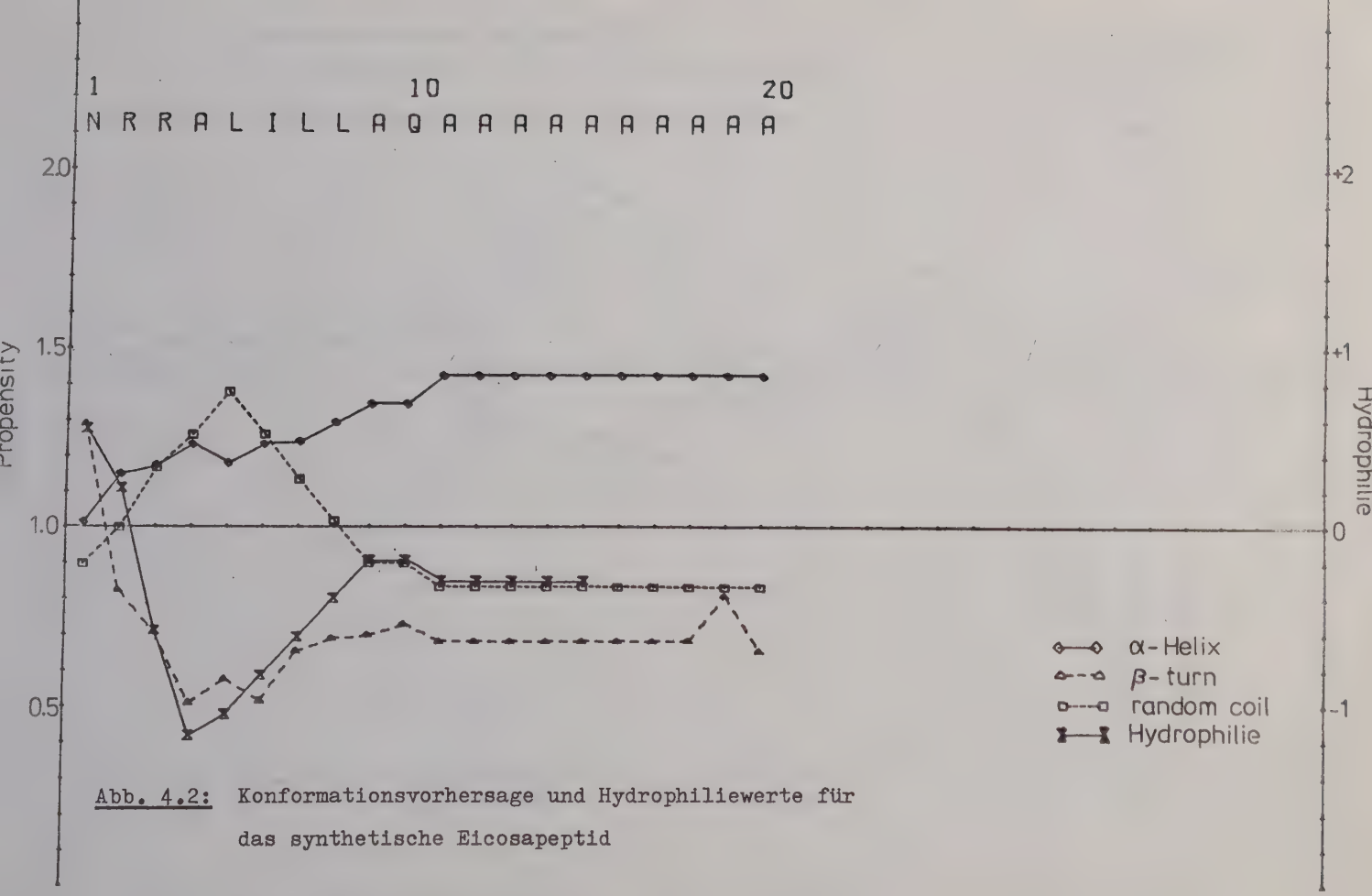


Abb. 4.2: Konformationsvorhersage und Hydrophiliewerte für das synthetische Eicosapeptid

4.2. Circulardichroismus von Peptiden

Mit Hilfe des Circulardichroismus können drei Grundtypen der Konformation unterschieden werden: α-Helix, β-Faltblatt und ς-Konformation (ungeordnetes Knäuel, random coil) (71). Anhand von Modellsubstanzen wie Poly-α-aminosäuren, die praktisch in nur einer dieser Standardkonformationen vorliegen, fand man für die rechtsgängige α-Helix einen negativen Cotton-Effekt bei 223 nm. Er wird hervorgerufen durch einen $n\pi^*$-Übergang der Peptidbindung (72,73). Bei kürzeren Wellenlängen tauchen zwei Cotton-Effekte mit entgegengesetzten Vorzeichen auf. Diese Aufspaltung des $\pi\pi^*$-Übergangs ("exciton splitting") in eine negative Bande bei 207-208 nm und eine positive bei 192-194 nm charakterisiert die α-helikale Konformation und kann theoretisch mit der unterschiedlichen Richtung der Übergangsmomente parallel und senkrecht zur Helixachse erklärt werden (74,75).

Peptide mit antiparalleler Faltblattstruktur sind durch ein Minimum bei 215-220 nm ($n\pi^*$-Übergang) und ein Maximum bei 195 nm ($\pi\pi^*$-Übergang) gekennzeichnet.

Die "ungeordnete" ς-Konformation weist ein schwaches Elliptizitätsminimum bei 222 nm und ein starkes Minimum bei 195 nm auf (76,77). In dieser Konformation bilden die Moleküle keine periodische Ordnungsstrukturen aus,

sind jedoch fest zueinander fixiert und verursachen daher Cotton-Effekte.

Mit Hilfe des Circulardichroismus' lassen sich durch Vergleich der experimentell erhaltenen CD-Spektren mit Modellspektren der drei Standardkonformationen Sekundärstrukturanteile berechnen. Man geht davon aus, daß das gemessene Spektrum eine Lineárkombination der drei Grundtypen darstellt. Mittels computerunterstützten Berechnungen wird diejenige Linearkombination ermittelt, die die beste Anpassung an das zu interpretierende Spektrum liefert (78,79).

Eine solche quantitative Auswertung der CD-spektroskopischen Daten ist bei den Verbindungen dieser Arbeit aus folgenden Gründen problematisch:

a) Die Peptide sind mit höchstens 20 Aminosäuren für eine zuverlässige Bestimmung des prozentualen Konformationsanteils zu kurz.

b) Die verfügbaren Rechenprogramme berücksichtigen weder den Einfluß der achiralen α-Aminoisobuttersäure noch Konformationen wie β-turns und 3_{10}-Helices. Gerade diese Strukturelemente sind jedoch in Aib-Peptiden begünstigt (28,82).

Aus diesen Gründen wurde auf eine Berechnung der Konformationsanteile der Peptidsegmente einschließlich des Eicosapeptids verzichtet.

Für den Fall, daß eine der Standardkonformationen überwiegt, liefert die CD-Spektroskopie wertvolle qualitative Aussagen hinsichtlich Konformationsänderungen durch Wechsel des Lösungsmittels, pH- oder Temperaturänderung. Die Ausbildung von Konformationen oder Konformationsübergänge während des Anwachsens der Peptidkette im Verlauf einer Synthese lassen sich CD-spektroskopisch verfolgen.
Obwohl erst durch Röntgenstrukturanalyse die Struktur und damit auch die Konformation vollständig geklärt werden kann, stellte die CD-Spektroskopie für die in dieser Arbeit synthetisierten Peptidsegmente eine Methode zur Konformationsbestimmung mit hohem dia-

4.2.1. CD-Spektren der Tri- bis Heptadekapeptid-Segmente und des geschützten Eicosapeptids

Folgende Peptide wurden CD-spektroskopisch untersucht:

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OMe

Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Die Spektren wurden in Trifluorethanol bei 20°C aufgenommen (Abb. 4.2.1.1).

Anhand der CD-Kurven läßt sich die Zunahme der helikalen Konformationsanteile mit wachsender Peptidlänge verfolgen. Das Minimum des $n\pi^*$-Übergangs ist im Hexapeptid noch sehr schwach ausgebildet; der $\pi\pi^*$-Übergang und das aus apparativen Gründen nicht ganz erfaßte "exciton splitting" weisen auf eine beginnende α-helikale Struktur hin.

Die CD-Kurven der größeren Peptide zeigen einen signifikanten bis hohen α-Helixanteil, der vom Undeka- bis zum Heptadekapeptid erwartungsgemäß stark ansteigt. Beim Übergang vom Deka- zum Undekapeptid überrascht die starke Intensitätszunahme des $n\pi^*$-Übergangs durch den Anbau von nur einer Aminosäure.

Die Ellipzizitäten des geschützten Eicosapeptids sind um ca. die Hälfte kleiner als die des Heptadekapeptids. Offenbar bewirkt der Anbau des polaren Tripeptid-Segments Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH eine Störung der α-Helix. Dieser Befund steht in Übereinstimmung mit den ^{13}C-NMRspektroskopischen Daten, die für das geschützte Eicosapeptid eine leichte Abnahme der α-helikalen Konformationsanteile gegenüber dem Heptadekapeptid anzeigen (Abschn. 3.4).

Aufgrund der Konformationsvorhersagen (Abschn. 4.1)

für das Eicosapeptid kann eine coil-ähnliche Struktur der polaren N-terminalen Aminosäuren angenommen werden, deren CD-Spektrum dem der dominierenden α-Helix überlagert ist. Ferner ist eine Modifizierung der starren Helixstruktur, die sich hauptsächlich auf die N-terminale Molekülhälfte auswirkt, in Betracht zu ziehen.

Das Spektrum des Tripeptids zeigt einen untypischen Kurvenverlauf mit einem schwachen Minimum bei 218 nm und einem starken bei 209 nm. Es liegen vermutlich random coil- und β-turn-Konformationen nebeneinander vor, deren Teilspektren sich überlagern.

4.2.2. CD-Spektren des freien Eicosapeptidesters - Lösungsmittelabhängigkeit

Im CD-Spektrum des freien Eicosapeptidesters in Trifluorethanol ist eine weitere Abnahme der α-helikalen Konformationsanteile gegenüber dem geschützten Eicosapeptid zu beobachten, was dem Einfluß der durch drei positive Ladungen außerordentlich gesteigerten Polarität des N-Terminus zuzuschreiben ist.
Zur Ermittlung der Lösungsmittelabhängigkeit wurden die Messungen in fünf verschiedenen Solventien unterschiedlicher Polarität und Lipophilie (Wasser, 1.1.1.3.3.3-Hexafluorpropanol-(2), Methanol, 1.1.1-Trifluorethanol, Ethanol) durchgeführt (Abb. 4.2.2.1).

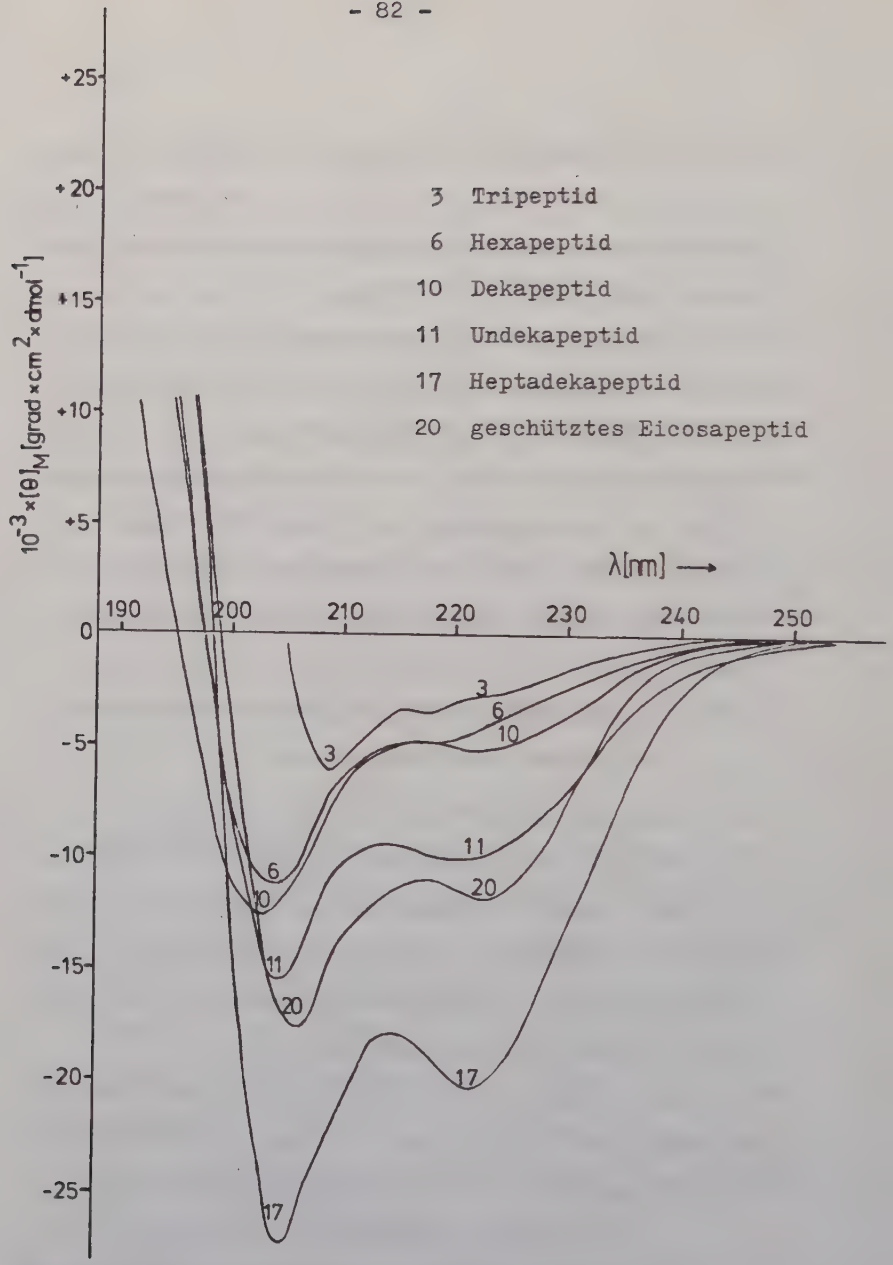


Abb. 4.2.1.1: CD-Spektren der Tri- bis Heptadekapeptid-Segmente und des geschützten Eicosapeptids in 1.1.1-Trifluorethanol; Temp.: 20°C, c = 0.5 mM

Die Spektren zeigen die typischen Cotton-Effekte einer α-Helix mit Minima bei 207 und 221 nm. Von einer geringen bathochromen Verschiebung in Methanol abgesehen, behalten die Minima ihre Lage bei. Die jeweiligen molaren Elliptizitäten steigen in der angegebenen Reihenfolge der Lösungsmittel an. Dies stimmt mit der an vielen anderen Beispielen beobachteten Tatsache überein, daß Ethanol und Trifluorethanol helixfördernde, 1.1.1.3.3.3-Hexafluorpropanol-(2) und vor allem Wasser helixbrechende Eigenschaften besitzen. Der helikale Konformationsanteil ist somit in Ethanol am größten, während das Molekül in Wasser als statistisches Knäuel vorliegt.

Die helixbildende Wirkung von Ethanol läßt sich anhand von Messungen in Wasser-Ethanol-Gemischen mit steigendem Ethanolgehalt (von 10 bis 90% Ethanol, in 10%-Schritten) verfolgen. Abb. 4.2.1.2 zeigt die vollständigen CD-Kurven der Messungen in den Wasser-Ethanol-Mischungen; Abb. 4.2.1.3 verdeutlicht den Verlauf der beiden Minima in allen verwendeten Lösungsmitteln bzw. -Gemischen sowie das jeweilige Verhältnis der molaren Elliptizitäten $[\Theta]_M^{221}/[\Theta]_M^{207}$.

Die Zunahme der $[\Theta]_M$-Werte folgt im Rahmen der Meßgenauigkeit der Konzentrationssteigerung an Ethanol. Der Grund für den Rückgang der Cotton-Effekte gegenüber

der jeweils vorangegangenen Messung bei 30 und 50% Ethanol ist nicht bekannt; Aufschluß über dieses abweichende Verhalten würden erst weitere CD-Untersuchungen ergeben, z.B. die Vermessung eines engeren Konzentrationsbereiches.

Das Verhältnis $[\Theta]_M^{221}/[\Theta]_M^{207}$ schwankt mit überwiegend geringen Abweichungen um den Wert von 0.8, was auf das Vorliegen von Monomeren in den Lösungen hinweist. Werte von > 1.0, die charakteristisch für Molekülaggregate sind werden nicht beobachtet.

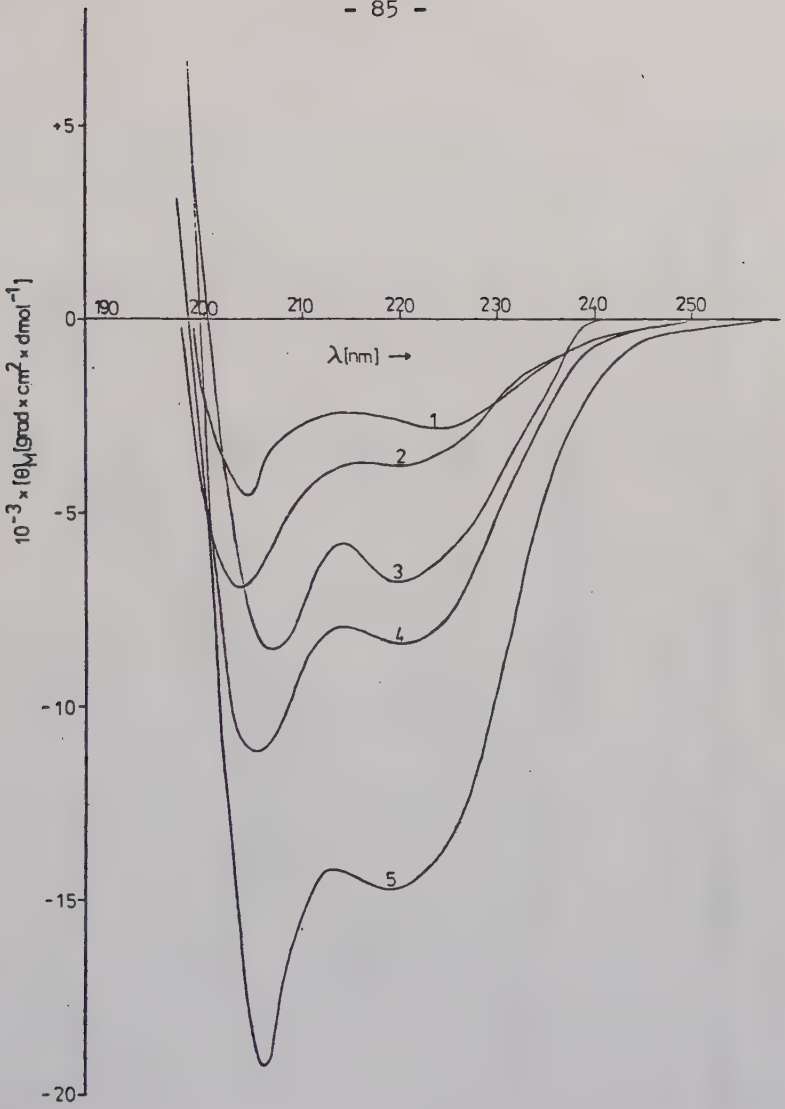


Abb. 4.2.1.2: CD-Spektren des freien Eicosapeptidesters in verschiedenen Lösungsmitteln:
1: H_2O, 2: 1.1.1.3.3.3-Hexafluorpropanol-(2), 3: Methanol, 4: 1.1.1-Trifluorethanol, 5: Ethanol;
Temp.: 20°C; c = 0.5 mM

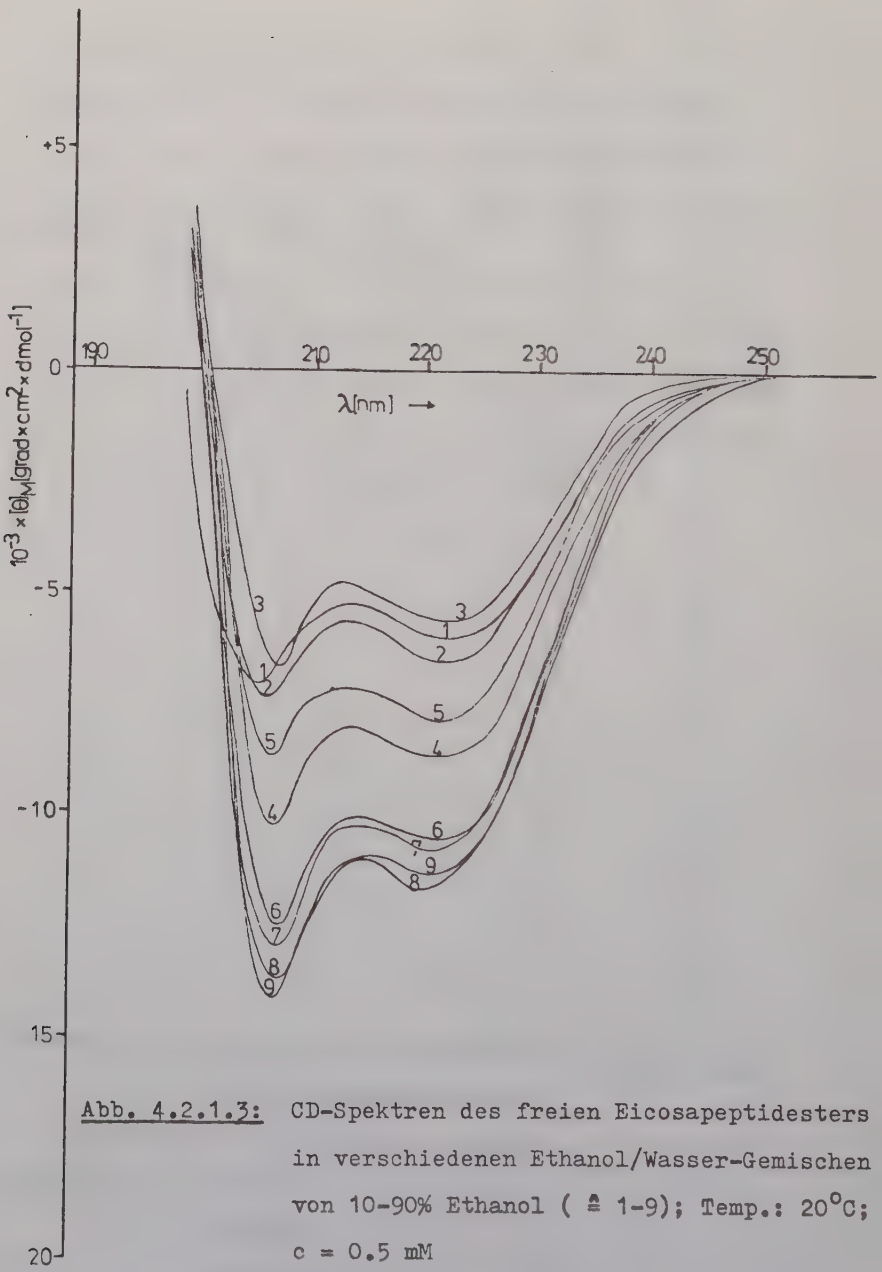


Abb. 4.2.1.3: CD-Spektren des freien Eicosapeptidesters in verschiedenen Ethanol/Wasser-Gemischen von 10-90% Ethanol (≙ 1-9); Temp.: 20°C; c = 0.5 mM

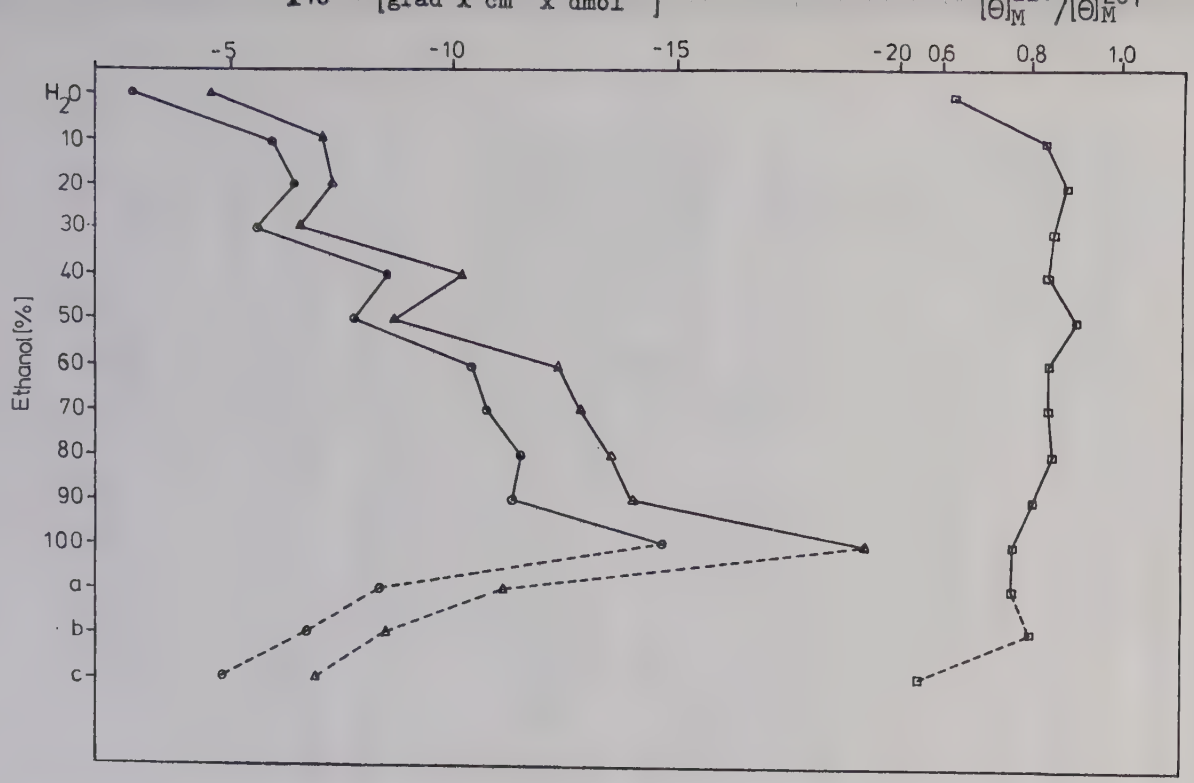


Abb. 4.2.1.4: Lösungsmittelabhängigkeit der CD-Spektren des freien Eicosapeptidesters; Verlauf der Minima der negativen Cotton-Effekte bei 207 nm (Δ) und 221 nm (o) und das Verhältnis $[\Theta]_M^{221}/[\Theta]_M^{207}$ (□); Temp.: 20°C; c = 0.5 mM
a: 1.1.1-Trifluorethanol; b: Methanol; c: 1.1.1.3.3.3-Hexafluorpropanol-(2)

5.1. Bestimmung des Dipolmoments des freien Eicosapeptidesters

In einer α-Helix sind die Peptidbindungen über Wasserstoffbrücken fixiert und so ausgerichtet, daß die CO-Gruppen zum N-Terminus weisen. Die Peptidbindungen besitzen je ein Dipolmoment, das durch Verschiebung von Elektronendichte zum Carbonylsauerstoff zustande kommt, so daß durch vektorielle Aufsummierung der einzelnen Dipolmomente für die α-Helix ein Gesamtdipolmoment resultiert, das entlang der Helix-Längsachse vom N- zum C-Terminus weist.

Die Dipolmomente werden mittels Dispersionsmessungen in einem Bereich von 5 KHz bis 50 MHz bestimmt (Meßanordnung s. [83]). Als Lösungsmittel ist aus meßtechnischen Gründen 1-Octanol oder Dioxan am besten geeignet; auch Ethanol/Wasser-Mischungen oder wassergesättigtes 1-Butanol finden Verwendung.

Es wird der Unterschied zwischen den Dielektrizitätskonstanten der Lösung und des Lösungsmittels, $\Delta\varepsilon_{pep}$, in Abhängigkeit von der Frequenz f gemessen. Der Messung liegt folgende Gleichung zugrunde:

$$\Delta\varepsilon_{pep} = \Delta\varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_{o}}{1+(f/f_{o})^{2}}$$

Dabei bedeuten $\Delta\varepsilon_\infty : \Delta\varepsilon_{pep}$ bei höchster Frequenz und $\Delta\varepsilon_o : \Delta\varepsilon_{pep}$ bei tiefster Frequenz. f_o ist die Dispersionsfrequenz (die Frequenz, bei der $\Delta\varepsilon_{pep}$ gegenüber $\Delta\varepsilon_o$ auf die Hälfte abgefallen ist).

Das Dipolmoment μ berechnet sich aus der Debye-Onsager-Näherung (83)

$$\frac{\Delta\varepsilon_o}{C} = \frac{N_A g \cdot \mu^2}{3\varepsilon_v kT}$$

wobei c die Konzentration, M die Molmasse des Peptids, ε_v die Vakuumdurchlässigkeit und g ein von der Molekülgestalt abhängiger Korrekturfaktor darstellt. Als Molekülform wird ein Rotationsellipsoid mit den Halbachsen a und b angenommen.

Die Bestimmung dieser Halbachsen und damit eine Aussage über Länge und Dicke des Moleküls ergibt sich aus der Beziehung:

$$f_o = \frac{kT}{6\pi\eta v_o}\phi(p)$$

η bedeutet die Viskosität des Lösungsmittels, p das Halbachsenverhältnis a/b, $\phi(p)$ eine spezielle Funktion von p (83) und v_o das Molekülvolumen.

v_o erhält man über das spezifische Partialvolumen, $\bar{v}$:

$$v_o = \bar{v}\frac{M}{N_A}$$

$\bar{v}$ läßt sich anhand der Volumenzunahme bei Zugabe des Peptids zum Lösungsmittel bestimmen.
Dem so ermittelten Funktionswert $\phi(p)$ entspricht ein bestimmter Wert für p, der nach folgender Beziehung die Halbachsen a und b liefert:

$$a^3 = (3/4\pi)p^2 v_0 \; ; \quad b = \frac{a}{p}$$

Diese Beziehungen gelten nur für den Fall, daß das Dipolmoment in die Richtung der großen Halbachse a weist.
Die Dipolmomente von Eicosapeptid-Helices mit überwiegend hydrophoben Resten liegen in der Größenordnung von 40 bis 80 D; für das Eicosapeptid Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_4$-OMe wurden 64 D (84) und für Alamethicin 75 D (83,85) (jeweils in 1-Octanol) gemessen. Für das freie Eicosapeptid ist wegen der Anwesenheit dreier permanenter, positiver Ladungen ein höheres Dipolmoment zu erwarten.
Die dielektrische Messung des freien Eicosapeptids wurde in Dioxan/Wasser (72:28; v:v) ausgeführt, da das Peptid in 1-Octanol und Dioxan sowie in wassergesättigtem 1-Butanol unlöslich war.
Es wurde ein Dipolmoment von 120 D ermittelt; die Länge des Rotationsellipsoids errechnete sich zu 43 Å, die Dicke zu 11 Å. Aus den Abmessungen eines maßstabsgetreuen CPK-Modells mit voll ausgebildeter α-Helix

ergaben sich in sehr guter Übereinstimmung die Werte 33 Å (max. ca. 38 Å) und 11 Å (max. ca. 15 Å) für Länge und Dicke des Moleküls.+

Abb. 5.1.1. zeigt den Verlauf der dielektrischen Konstante einer Lösung von 1.5 mg/ml freien Eicosapeptids in Dioxan/Wasser (72:28). Interessant ist der Vergleich mit Melittin, für das ein Dipolmoment von 115 D in wassergesättigtem 1-Butanol gemessen wurde (86). Die Amphiphilie von Melittin ist invers zu der des freien Eicosapeptids; es besitzt innerhalb seines hydrophilen C-Terminus positive Ladungen an 2 Arginin- und 2 Lysin-Seitenketten. Es sei hier angemerkt, daß der argininhaltige C-Terminus des Melittins ohne Verlust der porenbildenden Aktivität enzymatisch abspaltbar ist.

Grundsätzlich muß bei der Auswertung der Meßdaten einer dielektrischen Messung die Möglichkeit berücksichtigt werden, daß die Peptidmoleküle aggregieren. Durch die dielektrische Messung wird nur das resultierende Dipolmoment erfaßt, das z.B. für eine dimere, antiparallele Anordnung Null, für ein head-to-tail-Dimer dagegen etwa doppelt so groß ist wie das Dipolmoment des Monomers. Ferner sind die relativen Konzentrationen von Monomeren und aller vorhandenen Oligomeren in Rechnung zu stellen.

+Die Messungen wurden von Herrn Dr. V. Rizzo, Arbeitsgruppe Prof. Dr. G. Schwarz, Basel, durchgeführt.

Als wertvolle Ergänzung zu dielektrischen Messungen bietet sich die Ultrazentrifugation an. Mit dieser Methode läßt sich die effektive Molmasse des Peptids und dadurch das Ausmaß der Aggregation in Lösung bestimmen. Die Meßergebnisse aus der Dipolmomentsbestimmung sind daraufhin entsprechend zu korrigieren. Dieses Verfahren wurde z.B. bei Alamethicin (83) und Trichotoxin (87) angewandt; diese beiden Polypeptide aggregieren zu größeren oligomeren Einheiten in der Lipidschicht und in Wasser.

Für das freie Eicosapeptid steht die Molmassenbestimmung in Dioxan/Wasser (72:28) durch Ultrazentrifugation noch aus. Das ermittelte Dipolmoment und vor allem die realistischen Werte für die Halbachsen a und b stellen jedoch einen überzeugenden Indizienbeweis für das Vorliegen monomerer α-Helices dar. Diese Vorstellung wird auch durch die Experimente zur spannungsabhängigen Porenbildung (Abschn. 7.) sowie die Spreitungsexperimente (Abschn. 6) gestützt.

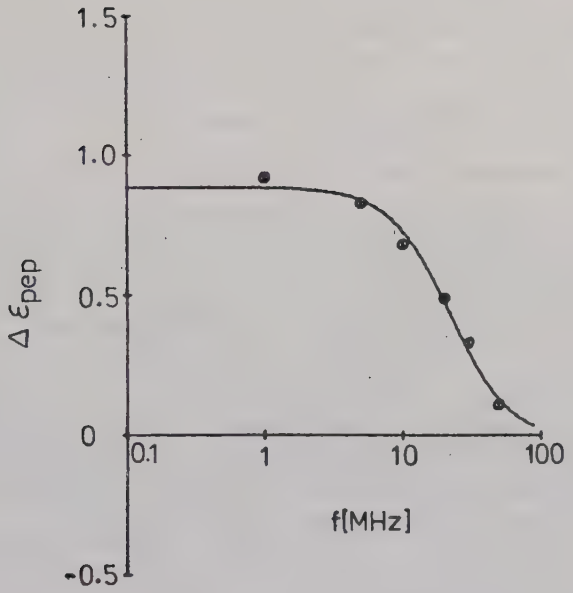


Abb. 5.1.1: Die dielektrische Konstante der Lösung des freien Eicosapeptidmethylesters in Dioxan/Wasser (72:28) in Abhängigkeit von der Frequenz; c = 1.5 mg/ml; Temp.: 25°C. Die Kurve wurde unter Verwendung der Gleichung

$$\Delta\varepsilon = \Delta\varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon_o}{1 + (f/f_o)^2}$$

berechnet, wobei $\Delta\varepsilon_o = 0.904$, $\Delta\varepsilon_\infty = -0.018$ und $f_o = 22.079$ MHz ist.

Dipolmoment: 120 D

Länge: 43 Å; Dicke: 11 Å

5.2. Differentialcalorimetrie der synthetischen Peptid-Zwischenstufen sowie von Alamethicin und Melittin in Lipiden

Die Methode der Differentialcalorimetrie (differential scanning calorimetry; DSC) nützt die Tatsache aus, daß in die Lipidphase eingebrachte Fremdmoleküle, wie z.B. Peptide oder Proteine, eine Änderung in der Enthalpie und der Temperatur des Phasenübergangs verursachen. Dadurch lassen sich Rückschlüsse auf Stärke und Art von Peptid-Lipid-Wechselwirkungen ziehen.

5.2.1. Methodische Grundlagen der DSC (88,89)

Die Probe der Peptid/Lipid-Mischphase und des reinen Referenzlipids werden in zwei getrennten Heizsystemen langsam aufgeheizt. Beim Aufheizen wird die Temperaturdifferenz zwischen Probe und Referenz stets auf Null gehalten. Es kann somit die Zufuhr oder Wegnahme von Energie gemessen werden, die für einen Ausgleich der beiden Heizraten notwendig ist.
Der differentielle Wärmestrom wird als Funktion der Temperatur aufgezeichnet. Der Phasenübergang der Probe erzeugt im Kurvenverlauf die Form eines Peaks, dessen

Scheitelpunkt als "Maximum des Wärmestroms" T_t bezeichnet wird. Die von dem Peak eingeschlossene Fläche stellt die Enthalpieänderung ΔH dar.
Der Begriff der kooperativen Einheit bezeichnet das molekulare Aggregat, das als Ganzes am Phasenübergang beteiligt ist. Bei Kenntnis der Größe dieses Aggregats läßt sich die Anzahl der Lipidmoleküle angeben, die durch ein Peptidmolekül immobilisiert, d.h. dem kooperativen Phasenübergang entzogen werden.
Die Molmasse der kooperativen Einheit berechnet sich aus dem Verhältnis der sogenannten van't Hoff-Enthalpie des Phasenübergangs, ΔH_{vH}, und der Enthalpie aus der calorimetrischen Messung, ΔH (88,90,91):

$$M_{kE} = \frac{\Delta H_{vH}}{\Delta H} \quad \text{wobei} \quad \Delta H_{vH} = \frac{4RT_t^2}{T_1 - T_2}$$

Die Anzahl immobilisierter Lipide pro Peptidmolekül läßt sich aus dem Diagramm $\Delta H/c_{Peptid}/c_{Lipid}$ (c in mol) durch Extrapolation von $\Delta H \rightarrow 0$ entnehmen.

5.2.2. Ergebnisse und Diskussion +

Das hier verwendete Lipid stammt aus der Zellwand des Procaryonten Thermoplasma acidophilum (T.a.), einem mycoplasmaähnlichen Mikroorganismus, dessen Wachstumsoptimum bei 59°C und pH 2 liegt (92-95).

+Die Messungen wurden von Herrn Dr. D. Blöcher, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Ring, Frankfurt, durchgeführt.

Das Membranlipid ist ein membranüberspannendes, regelmäßig verzweigtes Tetraetherlipid mit Glucoseresten an der Phosphatgruppe (Abb. 5.2.1). Die acht Verzweigungsstellen innerhalb der Kohlenwasserstoffkette verleihen der Membran eine hohe Fluidität bei gleichzeitiger hoher Stabilität. Der Übergang von der gelartigen in die flüssigkristalline Phase liegt um ca. 10°C niedriger als im unverzweigten DPPC.
Die Löslichkeit der Polypeptide in diesem sehr fluiden Lipid ist viel besser als in unverzweigten Analoga, sodaß alle Messungen in diesem Lipidsystem durchgeführt wurden.

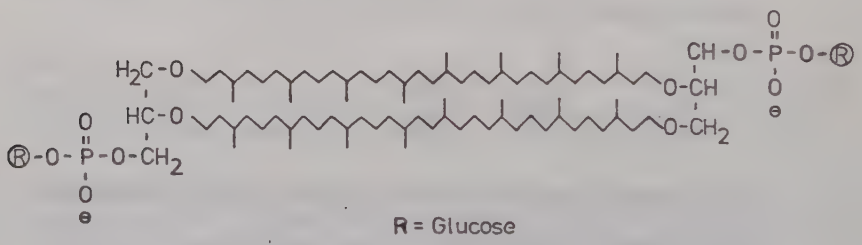


Abb. 5.2.1: Struktur des Membranlipids von Thermoplasma acidophilum

Die Phasenübergänge von 4 Peptid/Lipid-Mischphasen mit jeweils unterschiedlichen Mischungsverhältnissen wurden mit zwei Aufheizgeschwindigkeiten (0.04 und 0.06 K/s) gemessen (Abb. 5.2.2 u. 5.2.3). Die so ermittelten Ab-

hängigkeiten von T_t bzw. ΔH vom Verhältnis der molaren Konzentrationen c_{Peptid}/c_{Lipid} sind in Abb. 5.2.4 und 5.2.5 dargestellt. Entsprechende Diagramme wurden für Alamethicin und Melittin aufgenommen (Abb. 5.2.6 bis 5.2.9).

Es bilden sich mit allen Polypeptiden (Deka-, Undeka-, Heptadeka- und Eicosapeptid sowie Alamethicin und Melittin) Mischphasen, die den Phasenübergang unterdrücken und verbreitern. Diese Verzerrung der Enthalpie steigt mit zunehmender Kettenlänge der synthetischen Peptide. Abweichend von dieser Reihenfolge verursacht das Heptadekapeptid die stärkste Reduktion von T_t. Möglicherweise hat dieses lipophile Peptid eine besonders günstige Kettenlänge, die eine Membranüberbrückung noch ohne Wechselwirkung mit den polaren Lipidkopfgruppen ermöglicht.

Bei Alamethicin scheint die Schmelzkurve aus der Summe von zwei Anteilen zu bestehen: einer reduzierten aber unveränderten Schmelzkurve und einer zweiten ($-30^{\circ}C \rightarrow -15^{\circ}C$, $T_{max} = -20^{\circ}C$). Daneben treten noch weitere kleine Wärmetönungen auf: $-50^{\circ}C \rightarrow -30^{\circ}C$ und $10^{\circ}C$ $50^{\circ}C$. Für diese Messungen wurde natürliches, mikroheterogenes Alamethicin verwendet, sodaß ohne eine bislang noch ausstehende Vergleichsmessung mit einheitlichem, HPLC-gereinigtem, synthetischem Alamethicin

diese Anomalien in der Schmelzkurve nicht interpretiert werden können.
Die stärkste Enthalpie- und T_t-Reduktion verursacht Melittin, dessen thermotrope Eigenschaften bereits in DPPC gemessen wurden (96).

Vor einer zusammenfassenden Wertung der Meßergebnisse im Hinblick auf das thermotrope Verhalten anderer Polypeptide und Proteine sei eine Klassifikation bezüglich der Änderung von ΔH und T_t und die daraus abgeleiteten Modellvorstellungen über die Art der Protein-Lipid-Wechselwirkungen (Abb. 5.2.10) vorangestellt (nach Papahadjopoulos et al., 1975 [97]):

1. Erhöhung von ΔH; Erhöhung oder keine Veränderung von T_t (Polylysin [97 -99] und Ribonuclease [97,100, 101]) -
   Die hauptsächliche Peptid-Lipid-Wechselwirkung ist elektrostatischer Natur und spielt sich an der polaren Membranoberfläche ab (Abb. 5.2.10a). Es resultiert eine Stabilisierung der Membran.
2. Starke Erniedrigung von ΔH und T_t (Cytochrom C [97,102,103] und basisches Myelinprotein A1 [97, 101,104,105]) -
   Diese Wechselwirkung ist ebenfalls noch stark abhängig von negativen Nettoladungen an der Lipidoberfläche. Es wird eine Bindung des

Peptids an der Membranoberfläche mit nachfolgendem, partiellem Eindringen und/oder Deformation der Bilayer angenommen (Abb. 5.2.10b). Die Membran wird fluider und instabiler.

3. Erniedrigung von ΔH; kein Einfluß auf T_t (N-2 Apoprotein [105], Myelin-Lipophilin [97, 106], Glycophorin [107,108], Gramicidin A [103,109], Glucagon [110]) -

Man beobachtet eine lineare Abnahme von ΔH proportional zur Proteinkonzentration. Das Peptid ist in die Lipidphase eingebettet bzw. durchdringt sie. Durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Lipidkohlenwasserstoffketten ist es in der Membran verankert, die Lipidumgebung bleibt weitgehend ungestört (Abb. 5.2.10c).

Diese Vorstellung entspricht dem von Singer und Nicolson entwickelten Modell für biologische Membranen (22).

Die Invarianz von T_t gilt jedoch nicht streng und ist nicht in allen Fällen gegeben. Z.B. verursacht Valinomycin zusätzlich eine deutliche Erniedrigung von T_t (111). Auch der Lipidtyp spielt in einigen Fällen eine Rolle.

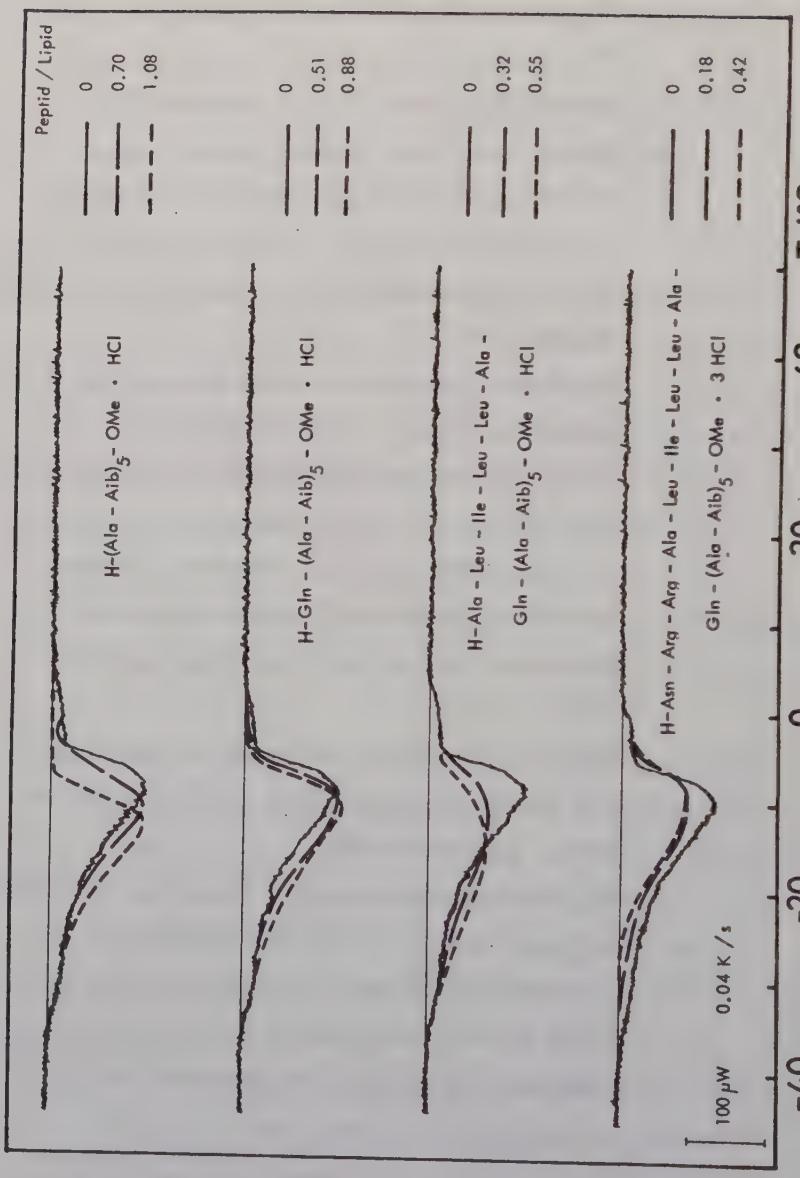


Abb. 5.2.2: Schmelzkurven von Mischphasen des Deka-, Undeka- und Eicosapeptids mit dem Membranlipid von T.a.; Heizrate: 0.04 K/s

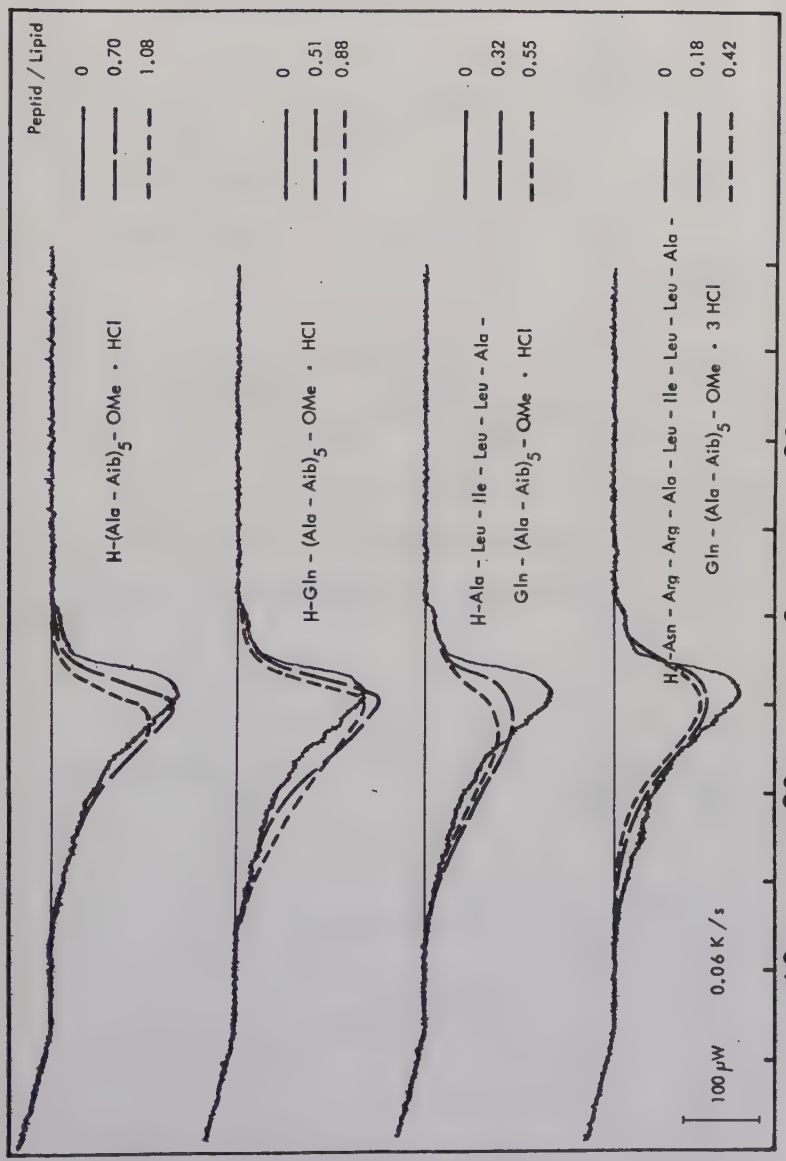


Abb. 5.2.3: Wie Abb. 5.2.2; Heizrate: 0.06 K/s

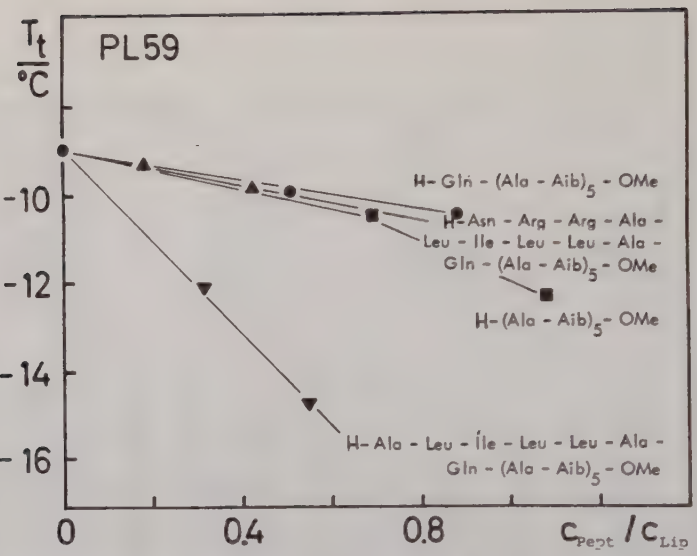


Abb. 5.2.4: Maximaler Wärmestrom T_t der Peptid/Lipid-Mischphasen in Abhängigkeit vom molaren Konzentrationsverhältnis c_{Pep}/c_{Lip}

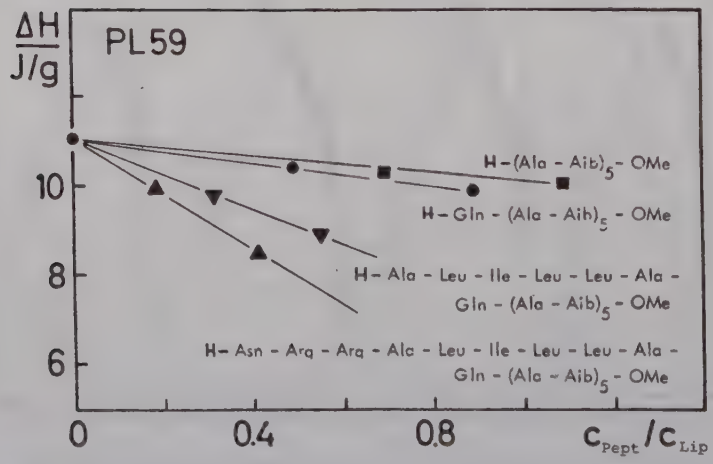


Abb. 5.2.5: Phasenübergangsenthalpie ΔH der Peptid/Lipid-Mischphasen in Abhängigkeit von c_{Pep}/c_{Lip}

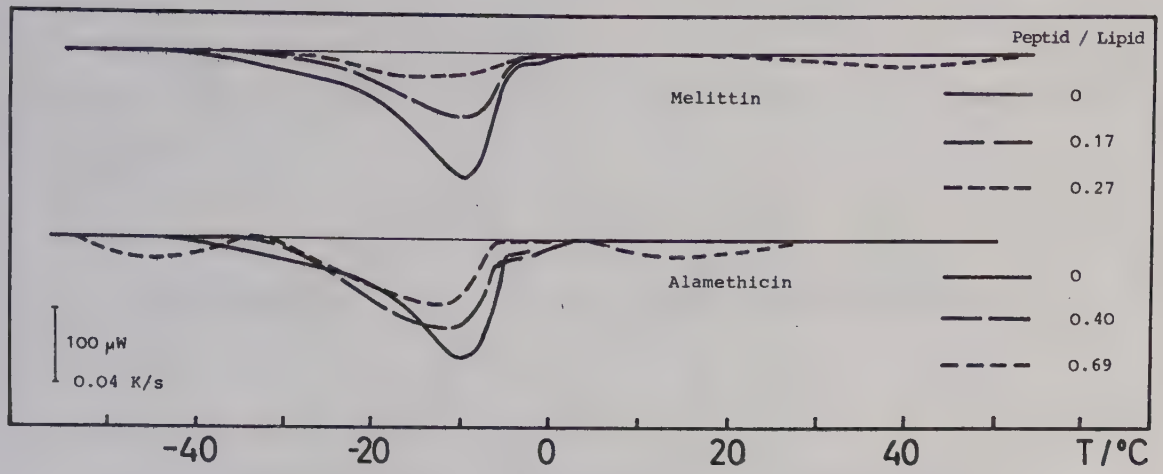


Abb. 5.2.6: Schmelzkurven der Mischphasen von Alamethicin und Melittin mit dem Membranlipid von T.a.; Heizrate: 0.04 K/s

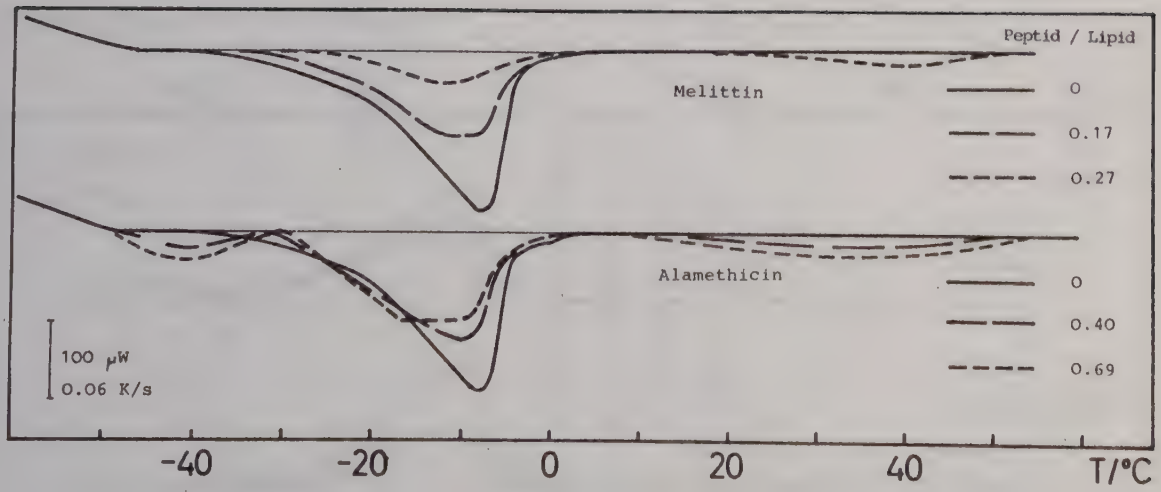


Abb. 5.2.7: Wie Abb. 5.2.6; Heizrate: 0.06 K/s

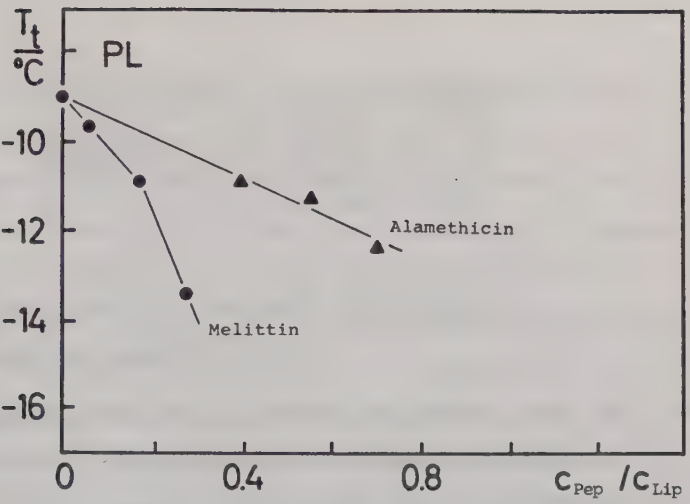


Abb. 5.2.8: Maximaler Wärmestrom T_t von Alamethicin bzw. Melittin-Mischphasen in Abhängigkeit von c_{Pep}/c_{Lip}

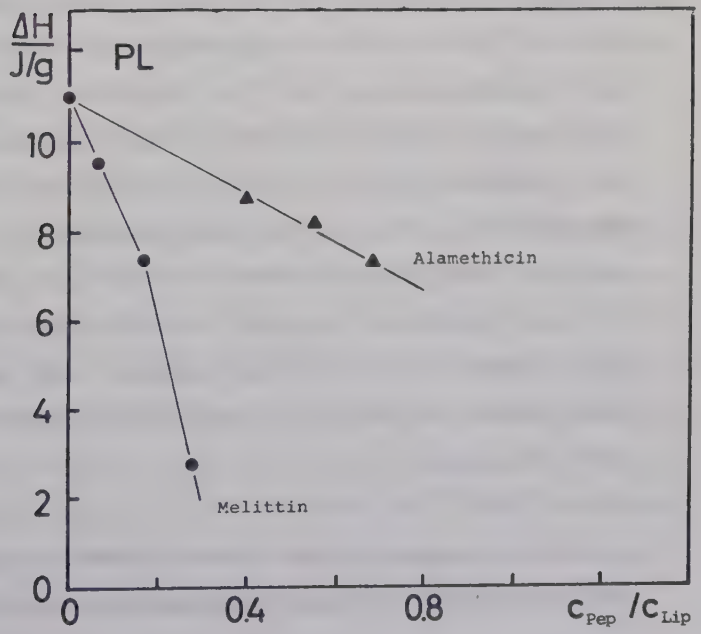


Abb. 5.2.9: Phasenübergangsenthalpie ΔH von Alamethicin- bzw. Melittin-Mischphasen in Abhängigkeit von c_{Pep}/c_{Lip}

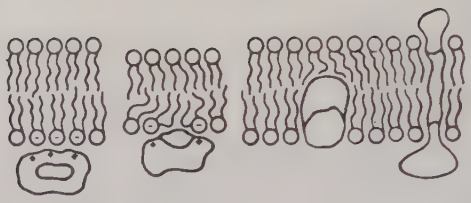


Abb. 5.2.10: Mögliche Arten der Protein-Lipid-Wechselwirkungen in Membranen

Die hier genannt drei Typen von Wechselwirkungen sind idealisierte Grenzfälle. In der Praxis hat man es mit Mischformen dieser Grenzfälle zu tun.
Die Art der Peptid-Lipid-Wechselwirkungen spiegelt sich auch in der Größe der kooperativen Einheit wieder. Cytochrom C immobilisiert 34 Lipide (in Phosphatidylglycerol), Ribonuclease 15 und N-2 Apoprotein 5 (jeweils in Phosphatidylcholin [97]). Cytochrom C (Gruppe 2) wechselwirkt intensiv mit den polaren Lipid-Kopfgruppen und verursacht durch partielles Eindringen eine starke Deformation der Membran. Ribonuclease (Gruppe 1) wird peripher an der Membran adsorbiert und verursacht einen geringen Störeffekt. Das ganz in die Membran eindringende N-2 Apoprotein (Gruppe 3) immobilisiert nur wenige Membranmoleküle und stört die Lipid-Ordnungsstruktur praktisch nicht.

Auf dem Hintergrund dieser Literaturwerte lassen sich die Meßergebnisse der synthetischen Peptide interpre-

tieren und die Art der Peptid-Lipid-Wechselwirkungen verstehen.

Wie aus den Abbildungen 5.2.4 und 5.2.5 hervorgeht, nimmt für das Deka-, Undeka- und Eicosapeptid T_t nur geringfügig ab, während ΔH in der angegebenen Reihenfolge sinkt. Diese Peptide sind also der Gruppe 3 zuzurechnen, und ihre Wechselwirkungen mit der Lipidmembran wird von der in Abb. 5.2.10c dargestellten Art sein. Die Peptide lagern sich in die Membran ein ohne einen starken Störeinfluß auf deren Ordnung etwa im Sinne einer Deformation auszuüben. Durch Extrapolation von ΔH gegen Null findet man, daß durch ein Eicosapeptidmolekül gerade 1 Lipidmolekül immobilisiert wird. Stellt man die membranüberspannende Struktur des Lipidmoleküls, das zwei Esterlipiden entspricht, in Rechnung, kommt man auf zwei Lipide pro Peptid. Analog dazu ermittelt man für das Heptadekapeptid 0.6 (1.2) Lipide pro Peptid.

Das Heptadekapeptid fällt durch seinen deutlichen Effekt auf T_t aus dem Rahmen der übrigen Peptide, sodaß hier eine stärkere Deformation der Membran anzunehmen ist. Dieser Befund überrascht insofern als aufgrund des hydrophoben Charakters dieses Peptids eine besonders störungsfreie Einlagerung in den apolaren Teil der Membran zu erwarten gewesen wäre. Der Grund für dieses abweichende Verhalten läßt sich nicht mit Sicherheit angeben. Da das Heptadekapeptid den höchsten α-helikalen Anteil

besitzt, liegt die Vermutung nahe, daß die Peptidkonformation eine Rolle spielt. Offensichtlich vermag das Molekül mit seiner starren Sekundärstruktur die flüssigkristalline Ordnung der Membranlipide empfindlich zu stören und übertrifft hierin das schwächer helikale Eicosapeptid sowie das Alamethicin.

Das Eicosapeptid besitzt im Gegensatz zu den anderen synthetischen Peptiden aufgrund seines extrem polaren und hydrophilen Endes durch polare Wechselwirkungen mit den Lipid-Phosphatgruppen eine zusätzliche Verankerungsmöglichkeit in der Membran, wodurch deren Ordnungsstruktur weit weniger gestört wird als durch das Heptadekapeptid. Offensichtlich bewirkt die Einlagerung der hydrophoben α-Helix des Heptadekapeptids eine Art Lochbildung in der polaren Region der Membran. Das Eicosapeptid und das Heptadekapeptid sind daher mit Alamethicin und Melittin vergleichbar. Alamethicin besitzt einen geringfügig höheren α-helikalen Konformationsanteil als das Eicosapeptid und ebenfalls amphiphilen Charakter. Allerdings hat Alamethicin ein weniger stark polares Ende ohne permanente Ladungen (Komponente F 50). Es verhält sich bezüglich seiner Wechselwirkungen mit den Membranlipiden sehr ähnlich wie das Eicosapeptid und vermag ca. 0.5 (1.0) Lipidmoleküle zu immobilisieren. Der Befund, daß sich nur etwa 1 Lipidmolekül dem Phasen-

übergang entzieht, kann auch mit der Bildung größerer Peptidaggregate in der Lipidschicht erklärt werden. Solche Entmischungen wurden bei Monoschichtexperimenten (Abschn. 6.) beobachtet.
Melittin dagegen stört die Membranstruktur erheblich, wie aus der deutlichen Reduktion von T_t ersichtlich ist. Aufgrund des starken Effektes auf T_t und ΔH muß Melittin der Gruppe 2 zugeordnet werden, und für die Modellvorstellung bezüglich der Wechselwirkungen mit den verwendeten Membranlipiden gilt Abb. 5.2.10b (Membrandeformation und partielle Einlagerung). Diese Befunde bestätigen die in der Literatur berichteten Daten, die sich auf Messungen von Melittin in DPPC beziehen. In dem DPPC-System vermag jedoch Melittin 20 Lipide dem kooperativen Phasenübergang zu entziehen, also ca. 4 mal mehr als in der Tetraetherlipid-Membran (5.8 Lipide pro Peptid).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die synthetisierten Peptide in dem verwendeten Lipid gut löslich sind und sich in die Membran einlagern lassen. Dieser Einbau geschieht im Falle des Deka-, Undeka- und Eicosapeptids ohne stärkere Störung der Membran-Ordnungsstruktur. Das Eicosapeptid kann bezüglich seiner Wechselwirkung mit den verzweigten Tetraetherlipiden als Modellpeptid für Alamethicin angesehen werden obwohl es mit seinen zwei Argininresten hinsichtlich seiner Amphiphilie

und Polarität eher ein Melittinanalogon mit umgekehrtem Helixdipol darstellt. Melittin selbst zeigt in der Tendenz ähnliche nur stärker ausgeprägte Effekte wie das sehr hydrophobe, stark α-helikale Heptadekapeptid, die auf eine Deformation der Membran hinweisen.
Die bisherigen Ergebnisse ermutigen zur Fortsetzung dieser DSC-Untersuchungen. Die Natur der Peptid/Lipid-Wechselwirkungen wäre durch systematische Messungen weiterer hydrophober Analoga mit definierten Sekundärstrukturen unter Einbeziehung verschiedener Lipid-Typen zu klären.

6. Spreitungsexperimente +

6.1. Methodische und theoretische Grundlagen

Amphiphile Substanzen bilden beim Auftragen (Spreiten) auf eine Wasseroberfläche einen Film, der exakt die Dicke einer Molekülschicht hat (112). Ein solcher monomolekularer Film ist ein zweidimensionales System, an dem durch Variation von lateralem Druck, Fläche und Temperatur Phasendiagramme gemessen werden können. Üblicherweise werden die Isothermen mit einer sogenannten Langmuir-Filmwaage gemessen.
Die durch die gespreitete, amphiphile Substanz (Lipid oder Peptid) gebildete Monoschicht besitzt einen bestimmten Flächenbedarf und setzt der Verkleinerung dieser Fläche Widerstand entgegen. Analog den Druck-Volumen-Diagrammen (p/V-Diagramme) dreidimensionaler Systeme lassen sich p/A-Diagramme ("Schub-Flächen-Diagramme") der Monoschicht aufzeichnen (113).
Der Kurvenverlauf dieser Diagramme zeigt an, daß beim Zusammenschieben der monomolekularen Schicht Phasenumwandlungen stattfinden (Abb. 6.1.1) (114,115), die im einzelnen folgendermaßen charakterisiert sind:

+Die Messungen wurden von Herrn Dr. W. Praß, Arbeitsgruppe Prof. Dr. H. Ringsdorf, Mainz, durchgeführt.

a) Gasanaloge Phase -
Die Moleküle besitzen maximale laterale Mobilität; die hydrophoben Kohlenwasserstoffketten sind frei beweglich. Diese Phase läßt sich durch eine ideale Gasgleichung beschreiben.

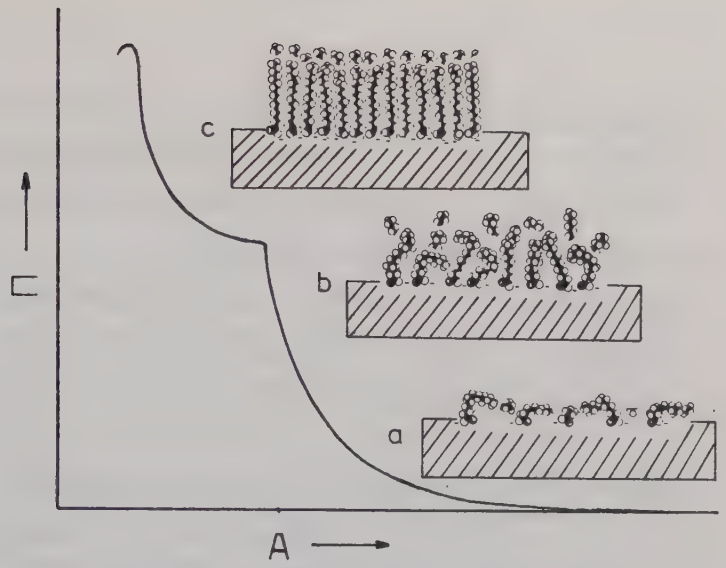
b) Flüssiganaloge Phase -
Die laterale Beweglichkeit ist stark eingeschränkt, so daß die hydrophilen Kopfgruppen untereinander Kontakt haben. Die hydrophoben Ketten sind aber noch weitgehend frei beweglich.

c) Festanaloge Phase -
Kopfgruppen und Kohlenwasserstoffketten sind dicht gepackt und ohne Bewegungsmöglichkeit. Durch eine gegeneinander versetzte Anordnung der Moleküle kann eine noch höhere Packungsdichte erreicht werden.

Der geringste Flächenbedarf eines festanalogen Films beträgt ca. 0.18 nm^2 pro Kette. Das entspricht der Querschnittsfläche von Kohlenwasserstoffen im Kristall.

Weitere Kompression führt durch Übereinanderschieben der einzelnen Schichten zu einem Kollaps der Monoschicht, die danach nicht mehr exakt definiert ist.

Abb. 6.1.1: Charakterisierung von Monoschichten an der Gas-Wasser-Grenzfläche durch Schub-Flächen-Diagramme (schematisch); Π: Oberflächendruck; A: Fläche



6.2. Ergebnisse und Diskussion

Für den freien Eicosapeptidmethylester wurden Mischungsreihen mit DPPC angefertigt. Wie aus den p/A-Diagrammen hervorgeht mischt sich das Peptid bis zu einer Konzentration von 10% mit DPPC unter Ausbildung stabiler Monoschichten. Peptid-Lipid-Mischungen mit höherem Peptidgehalt sowie der Eicosapeptidester alleine bilden keine stabilen, komprimierbaren Monoschichten. Das Peptid wird in diesen Fällen bei Verringerung der Fläche sofort in die wäßrige Phase gedrückt.

Aufgrund dieser Eigenschaft des Eicosapeptidesters ist die Mischungsreihe nicht mit der gewohnten Genauigkeit und Reproduzierbarkeit zu messen. Dieser Sachverhalt wird durch Abb. 6.2.1 verdeutlicht: Das Schub-Flächendiagramm des Peptids wurde sowohl mit einer Meßzeit von

10 min als auch unter Einhaltung des thermodynamischen Gleichgewichts, also in kleinen reversiblen Schritten aufgenommen. Bei Bildung einer stabilen Monoschicht mußten beide Kurven zusammenfallen.
Anhand von Diagrammen, in denen der Flächenbedarf der einzelnen Lipid-Peptid-Mischungen in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Mischmonoschichten aufgetragen ist, lassen sich die durch Peptid-Lipid-Wechselwirkungen verursachten Effekte in Form von Knicks erkennen. Im Fall des Eicosapeptids ist nur der Bereich von 0 bis 10% Peptidanteil interessant, in dem sich stabile Mischmonoschichten ausbilden.

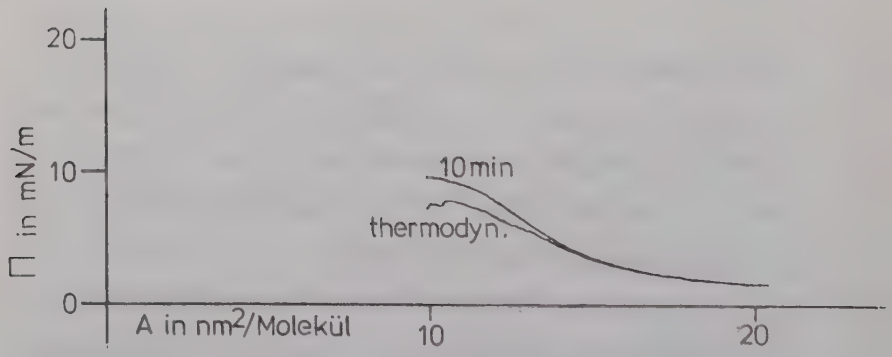


Abb. 6.2.1: Schub-Flächendiagramm des freien Eicosapeptidesters; a: im thermodynamischen Gleichgewicht; b) innerhalb 10 min Meßzeit

Abb. 6.2.2 zeigt den Flächenbedarf der verschiedenen Mischungen bei einem Druck von 2, 5 und 10 mN/m. In dem Bereich von 0-10% Peptidkonzentration ist ein sehr schwacher Knick erkennbar, der auf geringfügige Peptid-Lipid-Wechselwirkungen hinweist (116). Entsprechend findet man in Abb. 6.2.3 eine leichte Verschiebung des Phasenübergangs der 10%-Mischung.

Die Ergebnisse dieser Spreitungsexperimente erlauben folgende Schlußfolgerungen:

a) Das Eicosapeptid hält sich bis zu einer Konzentration von 10% in DPPC unter Ausbildung stabiler, kompressibler Monoschichten.

b) Kommen auf 1 Peptidmolekül weniger als 9 Lipidmoleküle, reichen die hydrophoben Wechselwirkungen zur Verankerung des Peptids in der Lipidphase nicht mehr aus, d.h. das Peptid wird in die Wasserphase gedrückt. Dieses Verhalten wird zum einen durch den sehr hydrophilen N-Terminus, zum anderen durch den Umstand, daß zwischen der stark verzweigten Peptidhelix und den unverzweigten Lipidkohlenwasserstoffen keine optimalen hydrophoben Wechselwirkungen möglich sind, begünstigt.

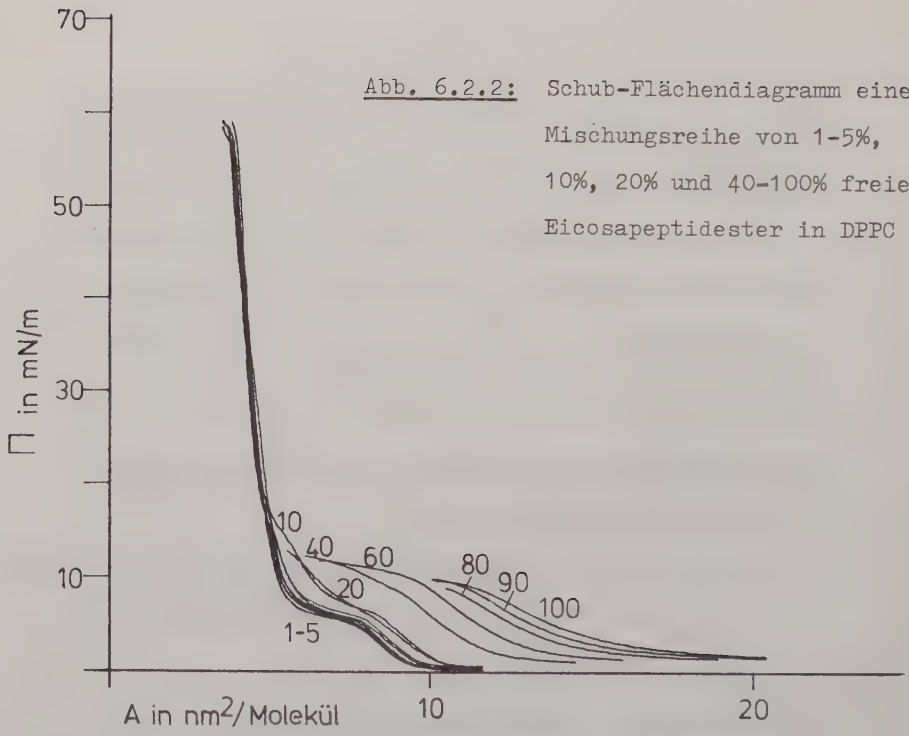


Abb. 6.2.2: Schub-Flächendiagramm einer Mischungsreihe von 1-5%, 10%, 20% und 40-100% freiem Eicosapeptidester in DPPC

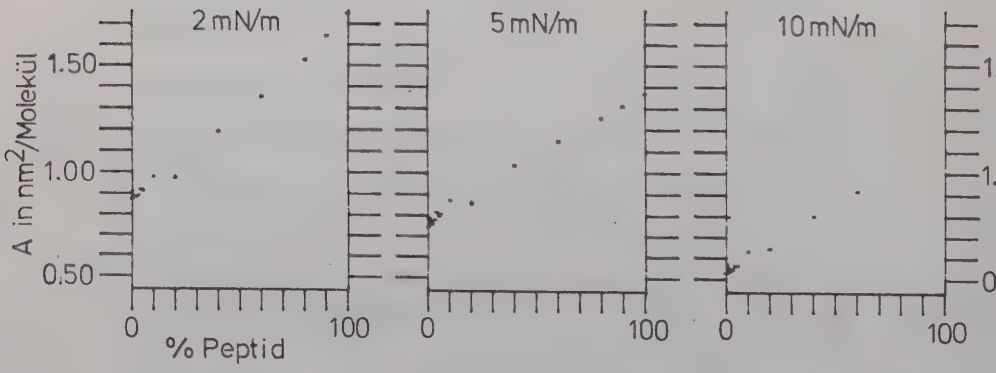


Abb. 6.2.3: Flächenbedarf der Mischmonoschichten bei Drücken von 2, 5 und 10 mN/m

7. Spannungsabhängige Porenbildung in Lipid-Doppelschichtmembranen

Sowohl die calorimetrischen Untersuchungen als auch die Spreitungsexperimente (Abschn. 5. und 6.) haben gezeigt, daß das synthetische Eicosapeptid in verschiedenen Lipiden löslich ist. Es bilden sich Mischphasen aus, und der Einbau in die Lipidphase erfolgt weitgehend ohne Störung der Membranstruktur. Dieser Befund ist besonders deshalb von Bedeutung, weil vorwiegend lipophile Helices wie Alamethicin höhere Aggregate in Lipidmembranen bilden können.

Die Untersuchung der makroskopischen Leitfähigkeitseigenschaften gibt Auskunft über die Art des Eintritts des Peptids in die Membran; die zeitliche Verfolgung der Leitwertfluktuationen gestattet den Nachweis von Porenbildung sowie, falls vorhanden, die Demonstration stabiler Einzelkanäle.

Die Leitfähigkeitsmessungen wurden sowohl am geschützten (N_α - und N_g-Nitro-Schutz) als auch am freien Eicosapeptidmethylester durchgeführt.[+]

Die Lipidmembran bestand aus 1.2-POPC/Cholesterin (9:1, molar:molar; 1.2-POPC = 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3 phosphatidylcholin). Das Lipid wurde aus einer Hexanlösung auf die Elektrolytoberfläche gespreitet. Der Lipid-Bilayer wurde an der Bohrung (Durchmesser 195 μm) eines

---

[+]Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Boheim, Bochum, durchgeführt.

mit Hexadekan vorbehandelten Sandwich-Teflon-Septums aus zwei Monolayern gebildet (116).

7.1. Ergebnisse und Diskussion

Die Abbildungen 7.1 und 7.2 zeigen die Strom-Spannungs-diagramme des geschützten Eicosapeptidesters, Abb. 7.3 die des freien Eicosapeptidesters.
Das Vorzeichen der Spannungsangabe bezieht sich vereinbarungsgemäß auf die cis-Seite; die trans-Seite liegt auf Erdpotential. Die positive Stromrichtung ist von der cis- zur trans-Seite.
Die Strom-Spannungs-Kurve wurde 20 min (Abb. 7.1) und 40 min (Abb. 7.2) nach Zugabe des geschützten Eicosapeptidesters aufgenommen. In beiden Fällen zeigt die Strom-Spannungskennlinie eine geringe Schaltspannung für den Beginn der Leitfähigkeitserhöhung auf der negativen Spannungsseite. Die 40 min nach Peptidzugabe durchgeführte Messung weist eine zu geringeren Werten verschobene Schaltspannung auf. Dies spiegelt eine höhere Konzentration des Peptids in der Membran wider.

Der freie Eicosapeptidester verursacht ebenfalls eine Spannungsasymmetrie (Abb. 7.3): Bei negativer Spannung erscheint die Leitfähigkeitserhöhung eher als bei positiver Spannung. Die Kennlinie wurde mehrfach durchgefahren um die Reproduzierbarkeit dieser Charakteristik zu demonstrieren.

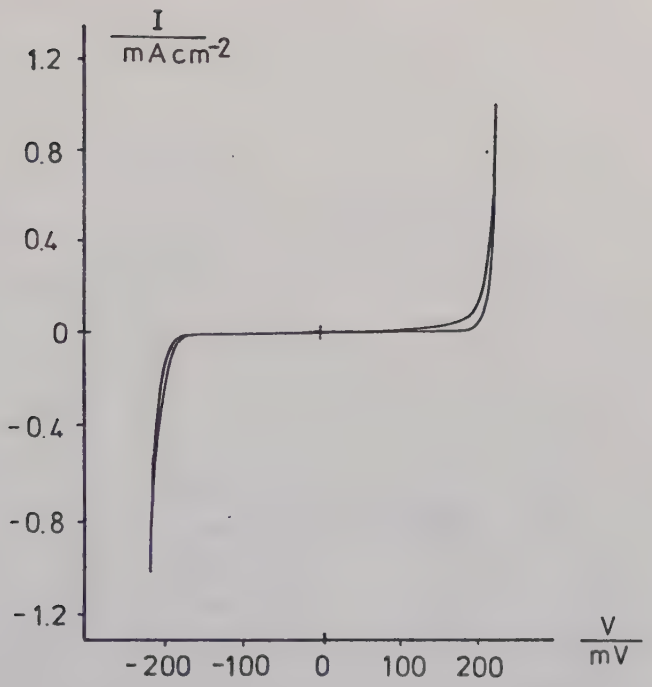


Abb. 7.1: Strom-Spannungskennlinie einer mit N_{α}-Boc-N_g-Nitro-geschütztem Eicosapeptid dotierten Lipid-Doppelschichtmembran: Messung 20 min nach Peptidzugabe; Lipid: 1-Palmitoyl-2-oleoyl-glycero-3-phosphocholin (1.2-POPC), Cholesterin (9:1; molar:molar); Elektrolyt: 1M KCl, 20 mM Hepes, pH 7.0, eingestellt mit KOH; Temp.: 22°C; Peptidkonzentration: c= 2.5 μg/cm^3

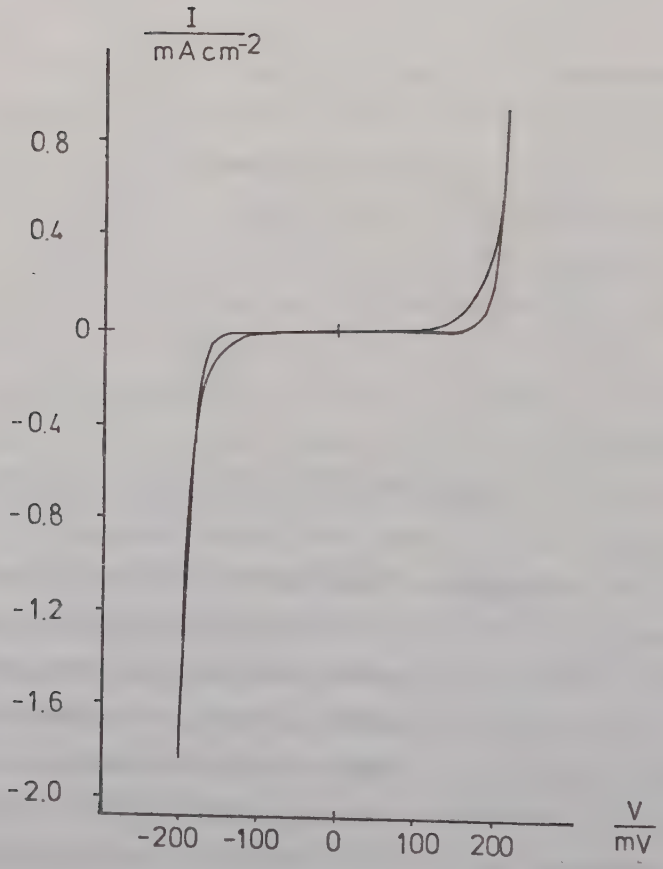


Abb. 7.2: Wie Abb. 7.1, jedoch 40 min nach Peptidzugabe

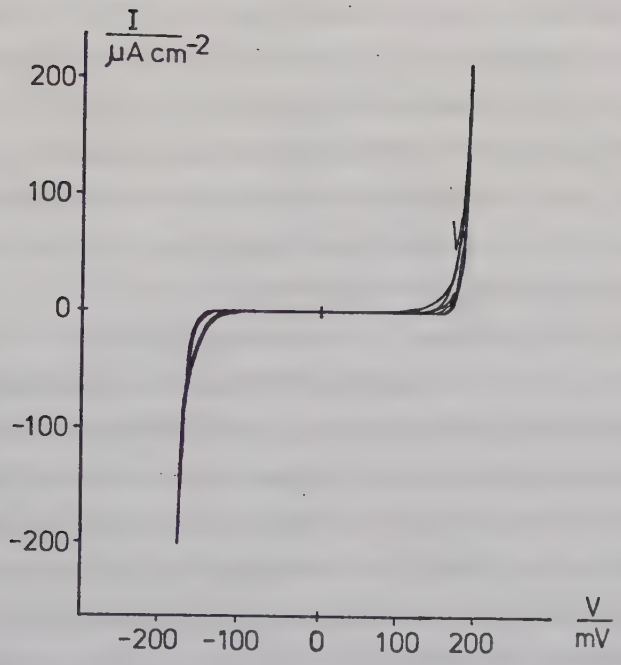


Abb. 7.3: Strom-Spannungskennlinie des freien Eicosapeptidmethylesters; c = 5 µg/cm^3; Bedingungen wie in Abb. 7.2

Der Vergleich mit der Kennlinie von Alamethicin(117,118) erlaubt Rückschlüsse auf die Ausrichtung des Moleküls in der Membran. Bei Zugabe von Alamethicin zur cis-Seite erscheint die erhöhte Leitfähigkeit zuerst auf der positiven Spannungsseite, während sie bei den beiden synthetischen Eicosapeptiden zuerst auf der negativen Spannungsseite beobachtet wird. Dies läßt sich dahingehend interpretieren, daß die Peptidhelices invers zu der des Alamethicins in der Membran orientiert sind. Beim Alamethicin zeigt das N-terminale Ende zur trans-Seite, während die Eicosapeptide mit dem C-Terminus zur trans-Seite hin orientiert sind.
Abb. 7.6 illustriert diesen Sachverhalt.
Aus dem Gleichverhalten der beiden Eicosapeptide ist zu schließen, daß die Ladungen am N-Terminus nicht entscheidend sind, sondern dessen hydrophiler Charakter bzw. die Amphiphilie des Gesamtmoleküls den Ausschlag gibt, welcher Terminus sich zuerst in die Lipidschicht einschiebt. Je nach Polarität des α-Helix-Dipols und Verteilung der Amphiphilie erfolgt das frühere Auftreten der Leitfähigkeitserhöhung bei positiver (Alamethicin) oder negativer (Eicosapeptide) Membranspannung.
Es sei erwähnt, daß auch die C-terminal ungeladene Alamethicinkomponente F 50 oder Suzukacillin sich wie das C-terminal negativ geladene Alamethicin F 30 verhalten.
Ähnliche Beobachtungen wurden an Trichotoxin-Analoga

gemacht (118).

Abb. 7.4 zeigt die zeitliche Auflösung der Leitwertfluktuationen für das geschützte Eicosapeptid. Bei positiver Spannung sind diskrete Leitwertstufen zu erkennen, die einem Leitwert von ca. 95 pS entsprechen (in 5 M NaCl). Dieser Wert ist etwa um den Faktor 250 geringer als der Leitwert für Boc-Alamethicin (2-20)-OBzl mit 25-30 nS. Im Einklang mit allen bisherigen Untersuchungen an N_{α}-Boc-geschützten Polypeptidestern wird auch beim geschützten Eicosapeptidester eine Kanalstruktur mit einem vorherrschenden Leitwert beobachtet (119). Der freie Eicosapeptidmethylester läßt keine diskreten Leitwertstufen erkennen. Sein Verhalten ähnelt den Leitwert-modifizierenden Eigenschaften von Trichotoxin (120). Da es dieselbe Länge wie Alamethicin besitzt, fehlt offenbar die zustandsstabilisierende Komponente. Dem im lipophilen Helixbereich sitzenden Glutaminrest des Alamethicins wird von anderen Gruppen große Bedeutung bei der Porenbildung beigemessen (31, 40). Da hier jedoch, wie im Alamethicin, auch ein Glutaminrest in der α-Helix vorhanden ist, aber keine stabilen Poren auftreten, liegt die Vermutung nahe, daß die intermolekularen Wasserstoffbrückenbindungen der Glutamin-Seitenkette keine stabilisierende Rolle spielen und nicht am Öffnen und Schließen der Poren beteiligt sind. Der Grund für das Ausbleiben stabiler Leitwertzustände

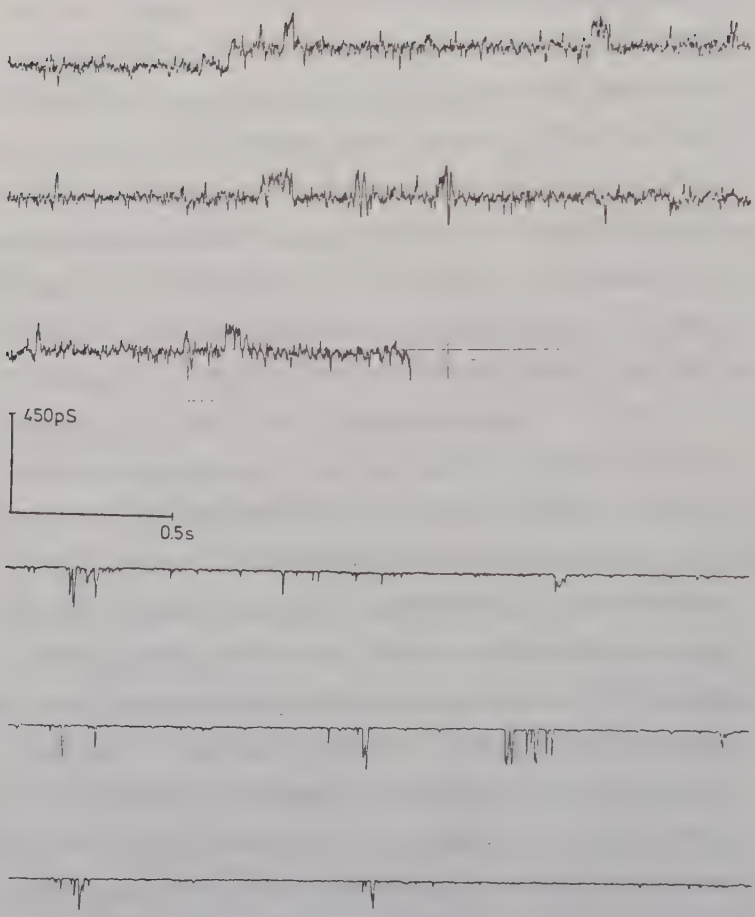


Abb. 7.4: Membranstrom-Fluktuationen, hervorgerufen durch Poren aus N_{α}-Boc-N_{g}-Nitro-geschütztem Eicosapeptidmethylester; Elektrolyt: 5 M NaCl, 20 mM Hepes, pH 7.0; Temp.: 23°C; c = 2.5 μg/cm^3; Membranspannung: +140 mV (oben), -140 mV (unten)

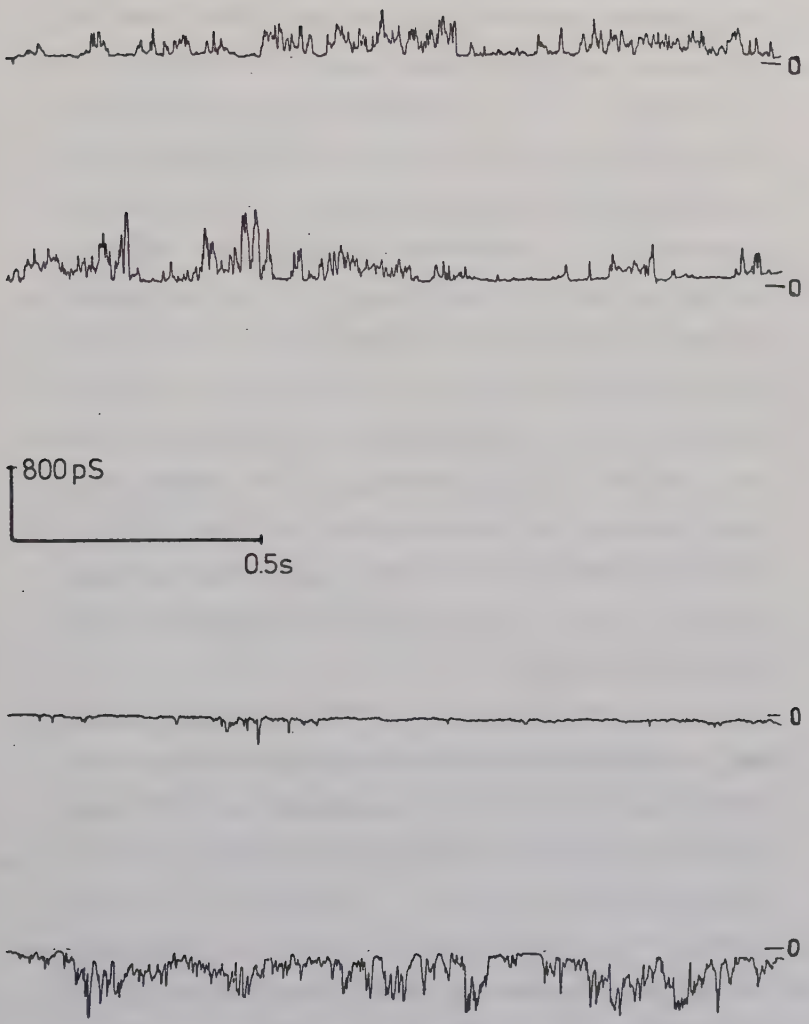


Abb. 7.5: Membranstrom-Fluktuationen des freien Eicosapeptidmethylesters; Membranspannung: +150 mV (oben), -150 mV (unten); Bedingungen wie in Abb. 7.4

gegenüber Alamethicin ist unter anderem in der Veränderung des hydrophilen Molekülteils zu sehen. Bei Alamethicin müssen hier offensichtlich stabile, intermolekulare H-Brückenbindungen ausgebildet werden, die in dieser Form bei Trichotoxin und dem demaskierten Eicosapeptid nicht möglich sind. Für die Stabilität porenbildender intermolekularer Aggregate spielen jedoch die sterischen Verhältnisse eine mindestens ebenso große Rolle wie die Möglichkeit zur Aggregation über H-Brücken, und diese sind vermutlich im Fall von Trichotoxin und dem Eicosapeptid ungünstig. Daß sterische Gründe ebenfalls wesentlich sein müssen, zeigt der Vergleich der Porencharakteristik von Alamethicin mit Boc-Alamethicin(2-20)-OBzl, wobei das letztere Peptid wesentlich größere Poren, d.h. größere Leitwerte induziert.

Insgesamt bestätigen die Leitfähigkeitsuntersuchungen die aus den dielektrischen Messungen abgeleitete Vorstellung, daß das freie Eicosapeptid ausschließlich monomer vorliegt und keine Tendenz zur Bildung stabiler Aggregate zeigt.

Bezüglich der Orientierung des Moleküls lieferten die Strom-Spannungskennlinien das interessante Resultat, daß der Einbau der Helix in die Membran entgegengesetzt zu der bei Alamethicin und den anderen membranmodifizierenden Peptiden üblichen Ausrichtung erfolgt.

Der hydrophobe C-Terminus tritt in die Membran ein, der hydrophile N-Terminus ragt in das wäßrige Medium: die Konsequenz der zu Alamethicin inversen Amphiphilie des synthetischen Peptids.

Ferner geht aus den vergleichenden Messungen des geschützten und des freien Eicosapeptids hervor, daß die Anwesenheit permanenter Ladungen von untergeordneter Bedeutung ist. Sie üben keinen sichtbaren, verstärkenden Effekt auf das Leitfähigkeitsverhalten des Peptids aus. Es ist anzunehmen, daß dieser Hydrophile Sequenzabschnitt durch eine Hydrathülle und Gegenionen stark abgeschirmt ist.

Die Vorgänge nach Zugabe des Peptids und Anlegen der Spannung lassen sich somit in folgender Modellvorstellung veranschaulichen:

Der hydrophobe Teil des Peptids überquert primär die Membran von der Zugabeseite (cis-Seite) zur trans-Seite. Beim Einschalten negativer Spannung auf der cis-Seite ist das Molekül nach Einlagerung in die Membran bereits "richtig" orientiert; der positiv geladene, hydrophile N-Terminus ragt auf der cis-Seite in das wäßrige Medium hinein.

Bei positiver Spannung muß das Molekül nach Einbau in die Membran zusätzlich noch in die energetisch günstigere Lage "umflippen", sodaß der hydrophile Teil dann in das wäßrige Kompartiment der trans-Seite weist. Dementsprechend später erscheint auch die Leitfähig-

keitserhöhung.

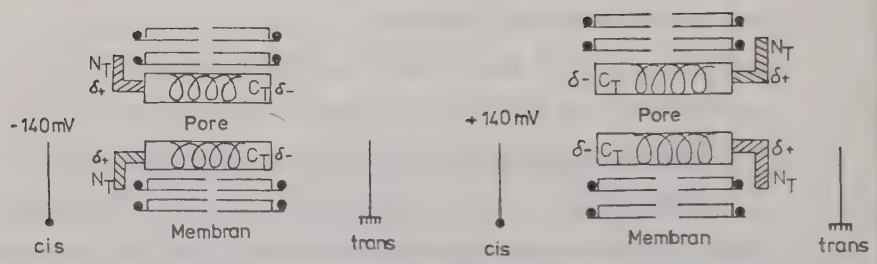


Abb. 7.6: Schematische Darstellung der Orientierung der amphiphilen Eicosapeptide, a: bei negativer, b: bei positiver Spannung; N_T = N-Terminus, C_T = C-Terminus, δ_+, δ_- = Partialladungen des α-Helixdipols

8. EXPERIMENTELLER TEIL

8.1. Material und Methoden

Chemikalien

Lösungsmittel p.a. und Reagentien wurden von der Fa. Merck (Darmstadt) bezogen, ansonsten nach üblichen Methoden getrocknet und destilliert. N-Methylmorpholin wurde über Ninhydrin destilliert. Alle L-Aminosäurederivate wurden von der Fa. Bachem (Bubendorf) bezogen. Boc-Aib-OH und H-Aib-OMe x HCl wurden nach Literaturvorschriften (121,122) synthetisiert.

Dünnschichtchromatographie

Es wurden Fertigplatten Kieselgel 60 F_{254} (Merck) und folgende Fließmittel verwendet:

(I) 1-Butanol/Eisessig/Wasser 3:1:1;

(II) Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 65:25:3:4;

(III) Chloroform/Methanol/konz. Ammoniak/Wasser 65:35:3:4;

(IV) Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4;

(V) Chloroform/Methanol 1:1.

Zur Detektion wurden eingesetzt: Wasser, Iod, Ninhydrin (123), Chlor/4,4'-Bis(dimethylamino)diphenylmethan (124) (TDM)
Als Referenz diente Dicyclohexylharnstoff: R_F(I) 0.91, R_F(II) 0.82, R_F(III) 0.92, R_F(IV) 0.81, R_F(V) 0.83.

Analytik

Zur Aminosäurenanalyse wurden von den geschützten Peptiden jeweils ca. 200 µg-Proben in 6 N HCl 24 h bei 110°C hydrolysiert. Zwischenstufen und Zielsequenz des Hexapeptidsegments, das die Leu-Leu-Bindung enthält, wurden 72 h hydrolysiert. Die Aminosäurenanalysen wurden mit einem Biotronik-Aminosäurenanalysator LC 6000 E unter Standard-Programmierung durchgeführt.[+] Die angegebenen Aminosäurenverhältnisse sind Einfachbestimmungen entnommen und nicht durch zeitabhängige Hydrolysen korrigiert.

Zur Racematbestimmung wurden die hydrolysierten Aminosäuren als Pentafluorpropionyl-aminosäure-n-propylester derivatisiert. Die Enantiomeren wurden an Glaskapillarsäulen mit Chirasil-Val (125) gaschromatographisch getrennt.

Elementaranalysen[++]

wurden als C,H,N-Einfachbestimmungen an einem Elemental-Analyzer Modell 1104 (Carlo Erba, Mailand) durchgeführt. Schmelzpunkte wurden nach Tottoli ermittelt und sind nicht korrigiert.

[+]Für die Durchführung dieser Analysen danke ich Frau M. Munari, Tübingen.

[++]Herrn Wurmstich, Tübingen, danke ich für diese Analysen.

Aufnahme der Spektren

^{13}C-NMR-Spektren: 30 mg des geschützten Eicosapeptids wurden in 400 µl $^{12}C,^{2}H$-Chloroform/Methanol (1:1) (Merck) gelöst und im NMR-Spektrometer WM 400 (Fa. Bruker-Physik, Karlsruhe) 12 h bei 30°C vermessen. Circulardichroismus-Spektren: Lösungen des freien Eicosapeptids (c = 1-1.7 mg/ml) in Ethanol, Trifluorethanol, Methanol, 1.1.1.3.3.3-Hexafluorpropanol-(2), Wasser sowie Ethanol/Wasser-Mischungen wurden mit dem Dichrograph II (Fa. Jouan-Roussel) bei 20°C vermessen.

Chromatographische Reinigungen

Die geschützten Peptid-Zwischenstufen wurden nach Beendigung der Kupplungsreaktion und Abziehen des Lösungsmittels am Ölvakuum durch Zugabe des gleichen Volumens Chloroform/Methanol (1:1) gelöst. Dann wurde der Dicyclohexylharnstoff abzentrifugiert und an Sephadex LH 20 chromatographiert: Säule 3 x 115 cm; Elutionsmittel Chloroform/Methanol (1:1); Auftragmenge 35 ml; Fließgeschwindigkeit 0.84 ml/min. Die Fraktionen (à 3 ml) wurden dünnschichtchromatographisch im System II untersucht (TDM-Reagens). Die Peptide (Deka- bis Eicosapeptid) erschienen im Elutionsvolumen 150 - 200 ml. Die Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen, und der Rückstand über P_2O_5 getrocknet.

8.2. Darstellung der Peptid-Segmente und des freien Eicosapeptidesters

Darstellung des Tripeptids Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH (Segment A)

Boc-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe

Boc-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe (15.97 g, 50 mmol) und HOBt (6.67 g, 50 mmol) in DMF (100 ml) wurden bei -10°C zu HCl x H-Arg(NO_2)-OMe (13.49 g, 50 mmol) und NMM (5.5 ml, 50 mmol) in DMF (100 ml) gegeben. Nach Zusatz von DCC (10.32 g, 50 mmol) in CH_2Cl_2 (12 ml) bei -10°C wurde 30 min bei -10°C, 1 h bei 0°C und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde die Reaktion mit einigen Tropfen Eisessig abgestoppt. Es wurde vom ausgefallenen DCH abfiltriert und das Lösungsmittel am Hochvakuum abgedampft. Der ölige Rückstand wurde in Essigester unter Zusatz von etwas n-Butanol zur Auflösung gebracht. Nach Waschen mit 5% $KHSO_4$-, 5% $KHCO_3$- und gesättigter NaCl-Lösung wurde die organische Phase über Na_2SO_4 getrocknet. Das Peptid wurde durch Zusatz von Petrolether (30-50) in der Kälte gefällt.

Ausbeute: 20.30 g (76%); Schmp. 130°C (Zers.); R_F(I) = 0.69, R_F(II) = 0.87, R_F(III) = 0.81, R_F(IV) = 0.32, R_F(V) = 0.42.

$C_{18}H_{54}N_{10}O_9$ (534.5)	ber.	C 40.45	H 6.41	N 26.20
	gef.	C 40.39	H 6.55	N 26.11

HCl x H-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe

Boc-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe (20.00 g, 37.42 mmol) wurde mit 1.2 N HCl/AcOH (110 ml) versetzt und nach 30 min in gerührten Ether (600 ml) gegossen. Dabei fiel dünnschichtchromatographisch reines HCl x H-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe aus.

Ausbeute:17.3 g (98%); R_F(I)= 0.37, R_F(II) = 0.29, R_F(III) = 0.44, R_F(IV) = 0.07, R_F(V) = 0.10.

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe

Boc-Asn-OH (8.39 g, 36.10 mmol) und HOBt (4.89 g, 36.10 mmol) in DMF (75 ml) wurden bei -10°C, 1 h bei 0°C und 3 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abbruch der Reaktion mit wenigen Tropfen Eisessig wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft und der Rückstand in wenig Methanol aufgenommen. Diese Lösung wurde unter Rühren zu trockenem Ether getropft. Der Rückstand wurde abfiltriert und in Methanol aufgenommen. In der Kälte fiel reines Tripeptid aus.

Ausbeute:18.25 g (78%); Schmp. 170°C; R_F(I) = 0.59, R_F(II) = 0.67, R_F(III) = 0.66, R_F(IV) = 0.45, R_F(V) = 0.65.

ASA: Asx 1.00 (1), Arg 1.85 (2)

$C_{22}H_{40}N_{12}O_{11}$ (648.6) ber. C 40.74 H 6.22 N 25.91

gef. C 40.70 H 6.40 N 25.79

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OMe (18.00 g, 27.75 mmol) wurde in Methanol (180 ml) mit 1 N NaOH (80 ml) bei Raumtemperatur verseift. Nach 2 h wurde mit verd. HCl neutralisiert und das Methanol i. Vak. abgedampft. Bei pH 3 wurde erschöpfend mit Essigester extrahiert. Die organischen Phasen wurden mit wenig gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und aus einer methanolischen Lösung bei -20°C kristallisiert. Ausbeute: 15.84 g (90%); Schmp. 228°C (Zers.); R_F(I) = 0.49, R_F(II) = 0.21, R_F(III) = 0.26, R_F(IV) = 0.05, R_F(V) = 0.21

Darstellung des Heptadekapeptid-Segments Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH

Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe (46) (10.03 g, 20 mmol) wurde in Methanol (150 ml) mit 1 N NaOH (40 ml, 40 mmol) verseift. Nach 2.5 h wurde mit 1 N HCl neutralisiert,

i. Vak. eingedampft und zwischen Essigester/5% $KHCO_3$ (1:1; v:v; 1000 ml) verteilt. Die wäßrige Phase wurde mit 5% $KHSO_4$ auf pH 4 angesäuert und mit Essigester/1-Butanol (5:1; v:v) fünfmal extrahiert. Die organische Phase wurde über Na_2SO_4 getrocknet, mit Petrolether (30-50) versetzt und die Pentapeptidsäure in der Kälte gefällt.

Ausbeute: 6.54 g (65%), Schmp. 195°C (Zers.), R_F(I) = 0.72, R_F(II) = 0.80, R_F(III) = 0.87, R_F(IV) = 0.95, R_F(V) = 0.80.

ASA: Ala 3.00 (3), Aib 1.98 (2).

$C_{22}H_{39}N_5O_8$ (501.6)	ber.	C 52.68	H 7.84	N 13.96
	gef.	C 52.70	H 7.90	N 13.89

Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OH (1.75 g, 3.48 mmol) und HOBt (470 mg, 3.48 mmol) in DMF (10 ml) wurden bei -10°C zu HCl x H-Ala-Aib-Ala-Aib-Ala-OMe (46) (1.57 g, 3.48 mmol) und NMM (384 µl, 3.48 mmol) in DMF (8 ml) gegeben. Nach Zugabe von DCC (825 mg, 4.00 mmol) in CH_2Cl_2 (3 ml) bei -10°C wurde unter langsamem, selbständigem Erwärmen 15 h gerührt. Nach Abstoppen der Reaktion mit einigen Tropfen Eisessig wurde vom ausgefallenen DCH abzentrifugiert, der Rückstand zweimal

mit kaltem DMF gewaschen und das Lösungsmittel am Ölvakuum abgedampft. Der Rückstand wurde in 10 ml Chloroform/Methanol (1:1; v:v) aufgenommen und an Sephadex LH 20 in Chloroform/Methanol (1:1) chromatographiert.

Ausbeute: 2.25 g (72%), Schmp. 160°C, R_F(I) = 0.61, R_F(II) = 0.76, R_F(III) = 0.83, R_F(IV) = 0.95, R_F(V) = 0.81.

$C_{40}H_{70}N_{10}O_{13}$ (899.1) ber. C 53.44 H 7.85 N 15.58
gef. C 53.42 H 7.90 N 15.40

HCl x H-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (2.05 g, 2.28 mmol) wurde mit 1.2 N HCl/Eisessig (10 ml) versetzt. Nach 30 min Rühren wurde das Hydrochlorid mit Ether gefällt, abfiltriert und am Ölvakuum über KOH getrocknet.

Ausbeute: 1.81 g (95%), R_F(I) = 0.50, R_F(II) = 0.38, R_F(III) = 0.71, R_F(IV) = 0.48, R_F(V) = 0.53.

Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Gln-OH (997 mg, 4.05 mmol) und HOBt (547 mg, 4.05 mmol) in DMF (10 ml) wurden bei -10°C zu HCl x H-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (2.25 g, 2.70 mmol) und NMM (298 µl, 2.70 mmol) in DMF (13 ml) gegeben. Nach Zusatz

von DCC (846 mg, 4.10 mmol) in CH_2Cl_2 (2 ml) bei -10°C wurde unter langsamem, selbständigem Erwärmen 15 h gerührt. Nach Abbruch der Reaktion mit einigen Tropfen Eisessig wurde vom ausgefallenen DCH abzentrifugiert, der Rückstand zweimal mit wenig kaltem DMF gewaschen und das Lösungsmittel am Ölvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 10 ml Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und an Sephadex LH 20 in Chloroform/Methanol (1:1) chromatographiert.

Ausbeute: 2.60 g (94%), Schmp. 223°C (Zers.); R_F(I) = 0.66, R_F(II) = 0.73, R_F(III) = 0.79, R_F(IV) = 0.94, R_F(V) = 0.80.

$C_{45}H_{78}N_{12}O_{15}$ (1027.2) ber. C 52.62 H 7.65 N 16.36
gef. C 52.65 H 7.68 N 16.32

HCl x H-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (2.60 g, 2.70 mmol) wurde mit 1.2 N HCl/Eisessig (15 ml) versetzt. Nach 40 min wurde das Hydrochlorid unter Rühren mit Ether gefällt, abfiltriert und am Ölvakuum über KOH getrocknet.

Ausbeute: 2.21 g (85%); R_F(I) = 0.48, R_F(II) = 0.25, R_F(III) = 0.54, R_F(IV) = 0.24, R_F(V) = 0.35.

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-OH (55) (760 mg, 1.07 mmol) und HOBt (145 mg, 1.07 mmol) in DMF (12 ml) wurden bei Raumtemperatur zu HCl x H-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)-OMe (818 mg, 0.85 mmol) und NMM (94 µl, 0.85 mmol) in DMF (10 ml) gegeben. Nach Zugabe von DCC (227 mg, 1.10 mmol) in CH_2Cl_2 (1.5 ml) wurde 64 h gerührt. Nach Abbruch der Reaktion mit wenigen Tropfen Eisessig wurde vom ausgefallenen DCH abzentrifugiert, der Rückstand zweimal mit wenig kaltem DMF gewaschen und das Lösungsmittel am Ölvakuum entfernt. Der Rückstand wurde in 8 ml Chloroform/Methanol (1:1) aufgenommen und an Sephadex LH 20 in Chloroform/Methanol (1:1) chromatographiert. Ausbeute: 774 mg (57%); Schmp. 260°C (Zers.); R_F(I) = 0.80, R_F(II) = 0.86, R_F(III) = 0.91, R_F(IV) = 0.77, R_F(V) = 0.78.

ASA: Glx 1.00 (1), Ile 0.89 (1), Leu 3.10 (3), Aib 4.08 (4), Ala 7.95 (8).

$C_{75}H_{132}N_{18}O_{21}$ (1622.0) ber. C 55.54 H 8.20 N 15.54
gef. C 55.58 H 8.31 N 15.52

Darstellung des Eicosapeptids Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

HCl x H-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OM

Boc-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (754 mg, 0.465 mmol) wurde mit 1.2 N HCl/Eisessig (10 ml) versetzt. Nach 50 min wurde am Ölvakuum etwas eingeengt und nach Zugabe von Wasser (10 ml) lyophilisiert.

Ausbeute: 690 mg (95%); R_F(I) = 0.71, R_F(II) = 0.52, R_F(III) = 0.78, R_F(IV) = 0.56, R_F(V) = 0.54.

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-OH (634 mg, 0.995 mmol) und HOBt (135 mg, 1.13 mmol) in DMF (5 ml) wurden bei -5°C zu HCl x H-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (620 mg, 0.398 mmol) und NMM (44 µl, 400 µmol) in DMF (7 ml) gegeben. Nach Zusatz von DCC (217 mg, 1.05 mmol) in CH_2Cl_2 (1.5 ml) bei -5°C wurde unter selbständigem Erwärmen 48 h gerührt. Nach Abbruch der Reaktion mit 3 Tropfen Eisessig wurde vom ausgefallenen DCH abzentrifugiert. Die Aufarbeitung und Reinigung durch Chromatographie erfolgte wie zuvor beschrieben.

Ausbeute: 630 mg (74%); Schmp. 195°C (Zers); R_F(I) = 0.70, R_F(II) = 0.51, R_F(III) = 0.56, R_F(IV) = 0.45, R_F(V) = 0.68.

ASA: Asx 0.94 (1), Glx 1.00 (1), Ile 0.89 (1), Leu 3.16 (3), Arg 1.95 (2) (ohne Korrektur auf Hydrolyseverluste).

$C_{91}H_{160}N_{30}O_{29}$ (2138.5) ber. C 51.11 H 7.54 N 19.65
gef. C 51.14 H 7.60 N 19.66

Darstellung des freien Eicosapeptidesters

Boc-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe x 2 HCl

Boc-Asn-Arg(NO_2)-Arg(NO_2)-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe (350 mg, 0.164 mmol) wurde in 3 ml wasserfreiem Methanol mit 35 mg Pd/Aktivkohle sowie 12 µl (0.075 mmol) 6 N HCl versetzt. Man leitete unter Rühren bei Raumtemperatur Wasserstoff durch die Lösung. Nach 20 min wurden 8 µl (49 µmol) und nach 35 min 7 µl (42 µmol) 6 N HCl zugegeben. Nach ca. 50 min Hydrierdauer war die Abspaltung nach DC-Kontrolle quantitativ. Der Katalysator wurde abfiltriert und mehrmals mit wenig Methanol gewaschen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer rasch abdestilliert (Öl-

pumpenvakuum, Badtemp. < 25°C), der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert.
Ausbeute: 332 mg (95%); R_F(I) = 0.16, R_F(II) = 0.11, R_F(III) = 0.21, R_F(IV) = 0.10.

H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe x 3 HCl

Boc-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe x 2 HCl (600 mg, 0.283 mmol) wurde mit 1.2 N HCl/Eisessig (5 ml) versetzt. Nach 30 min wurde etwas am Rotationsverdampfer eingeengt, mit Wasser (10 ml) versetzt und lyophilisiert.
Ausbeute: 564 mg (97%); Schmp. 245°C (Zers.);
R_F(I) = 0.11
$C_{86}H_{157}N_{28}O_{23}Cl_3$ (2057.7) ber. C 50.20 H 7.69 N 19.06 Cl 5.17
gef. C 50.31 H 7.78 N 18.91 Cl 5.28

9. ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese des membranmodifizierenden Eicosapeptids H-Asn-Arg-Arg-Ala-Leu-Ile-Leu-Leu-Ala-Gln-(Ala-Aib-Ala-Aib-Ala)$_2$-OMe wurde beschrieben. Das Zielpeptid konnte ohne zusätzlichen Reinigungsschritt aus dem geschützten Eicosapeptid durch Abspaltung der Nitrogruppen und der Boc-Schutzgruppe rein dargestellt werden. Es erwies sich als extrem amphiphile Peptidhelix, welche in Wasser, Methanol, Ethanol und anderen Lösungsmittel-Wasser-Gemischen löslich, in lipophilen Solventien wie 1-Octanol dagegen unlöslich ist.

Die synthetischen Zwischenstufen sowie das Zielpeptid wurden ausführlich spektroskopisch charakterisiert. Dabei wurden in allen höheren Synthesefragmenten einschließlich des Eicosapeptids mittels CD und ^{13}C-NMR hohe α-helikale Konformationsanteile gefunden.

Das Dipolmoment des freien Eicosapeptids wurde in Dioxan/Wasser (72:28) zu 120 D, Länge und Dicke zu 43 bzw. 11 Å bestimmt. Die biophysikalischen Untersuchungen bezüglich der membranmodifizierenden Eigenschaften des Zielpeptids umfaßten sowohl Experimente zur spannungsabhängigen Porenbildung, Spreitungsexperimente von Peptid-Lipid-Mischphasen als auch differentialcalorimetrische Messungen in Lipidsystemen.

Die Ergebnisse der dielektrischen Messung sowie der anderen Untersuchungen charakterisierten das Eicosapeptid als eine Verbindung, die

a) keine starken Wechselwirkungen mit Membranlipiden eingeht,
b) eine starke Affinität zu wäßrigen Solventien besitzt und
c) keine Aggregationstendenz in Lipiden und wäßrigem Dioxan zeigt.

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Anwesenheit von Ladungen die Peptid-Lipid-Wechselwirkungen weder verstärkt oder herabsetzt noch eine stabilisierende Rolle bei der Porenbildung in Lipiden spielt. Die Umkehrung der Amphiphilie im Eicosapeptid verglichen mit Melittin wirkte sich auf die Orientierung in der Membran bei Anlegen eines elektrischen Feldes aus.

In die Untersuchungen zur spannungsabhängigen Porenbildung wurde auch das N_{α}-Boc-N_{g}-nitro-geschützte Eicosapeptid einbezogen. Im Gegensatz zum ungeschützten Eicosapeptid ließen sich diskrete Leitwertstufen nachweisen.

Die differentialcalorimetrischen Messungen wurden zusätzlich auf das Deka-, Undeka- und Heptadekapeptid ausgedehnt. Überraschenderweise bewirkte das sehr

hydrophobe Heptadekapeptid eine beträchtliche Störung der Lipidstruktur.

Insgesamt kann das Eicosapeptid als amphiphiler Membrananker angesehen werden, dessen hydrophiles Ende an der Membranoberfläche exponiert ist. Die Ergebnisse zeigen, daß z.B. durch Kupplung von immunwirksamen Sequenzen an den N-Terminus des Peptids Konjugate darstellbar sind, die sich in Vesikeln einbauen lassen. Damit ist an deren Oberfläche eine Präsentation von antigenen Determinanten möglich.

10. LITERATURVERZEICHNIS

(1) B.C. Pressman, E.J. Harris, W.S. Jagger und J.H. Johnson, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 58, 1949-1956 (1967)

(2) S.B. Hladky und D.A. Hydon, Biochim. Biophys. Acta 274, 294-312 (1972)

(3) T. Ooka, Y. Shimojina, T. Akimoto, I. Takeda, S. Senoh und J. Abe, Agr. Biol. Chem. 30, 700-702 (1966)

(4) T. Ooka und I. Takeda, Agr. Biol. Chem. 36, 112-119 (1972)

(5) E. Katz, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

(6) C.T. Hou, A. Ciegler und C.W. Hesseltine, Applied Microbiology 23, 183 (1972)

(7) G. Irmscher, G. Bovermann, G. Boheim und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 507, 470-484 (1978)

(8) H. Brückner, W.A. König, M. Greiner und G. Jung, Angew. Chem. 91, 508-509 (1979); Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 18, 476-477 (1979)

(9) P. Meyer und F. Reusser, Experientia 23, 85-86 (1967)

(10) P. Müller und D.O. Rudin, Nature 217, 713-719 (1968)

(11) J.W. Payne, R. Jakes und B.S. Hartley, Biochem. J. 117, 757-766 (1970)

(12) T.M. Balasubramanian, N.C.E. Kendrick, M. Taylor,

(12) T.M. Balasubramanian, N.C.E. Kendrick, M. Taylor, G.R. Marshall, J.E. Hall, I. Vodyanoy und F. Reusser, J. Am. Chem. Soc. 103, 6127-6132 (1981)

(13) H. Mohr, Dissertation, Technische Universität Berlin (1977)

(14) G. Irmscher und G. Jung, Eur. J. Biochem. 80, 165-174 (1977)

(15) H. Schmitt, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

(16) G. Jung, H. Brückner und H. Schmitt, in: Structure and Activity of Natural Peptides (W. Voelter und G. Weitzel, Hrsg.), de Gruyter, Berlin 1981, 75-114

(17) R. Latorre und O. Alvarez, Physiol. Rev. 61, 77-150 (1981) und dort zitierte Literatur

(18) M. Eisenberg, J.E. Hall und C.A. Mead, J. Membr. Biol. 14, 143-176 (1973)

(19) L.G.M. Gordon und D.A. Haydon, Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 270, 433-447 (1975)

(20) G. Boheim und H.-A. Kolb, J. Membr. Biol. 38, 99-150 (1978)

(21) C.F. Fox, Sci. Amer. 226, 33-38 (1972)

(22) S.J. Singer und G.L. Nicolson, Science 175, 720-731 (1972)

(23) S.J. Singer, Annu. Rev. Biochem. 43, 805-830 (1974)

(24) M.S. Bretscher, Science 181, 622-629 (1973)

(25) G. Guidotti, Annu. Rev. Biochem. 41, 731-752 (1972)

(26) S.I. Chavin, FEBS Lett. 14, 269-282 (1971)

(27) A.R. Oseroff, P.W. Robbins und M.W. Burger, Annu. Rev. Biochem. 42, 647-680 (1972)

(28) C. Toniolo, G.M. Bonora, A. Bavoso, E. Benedetti, B. di Blasio, V. Pavone und C. Pedone, Biopolymers 22, 205-215 (1983)

(29) G. Jung, N. Dubischar und D. Leibfritz, Eur. J. Biochem. 54, 395-409 (1975)

(30) A.I. McMullen, D.J. Marlborough und P.M. Bayley, FEBS Lett. 16, 278-280 (1971)

(31) R.O. Fox und F.M. Richards, Nature 300, 325-330 (1982)

(32) G. Irmscher, Dissertation, Universität Tübingen (1977)

(33) G. Irmscher und G. Jung, Eur. J. Biochem. 80, 165-174 (1977)

(34) W.G. Bessler, B. Ottenbreit, G. Irmscher und G. Jung, Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 99-105 (1979)

(35) R. Nagaraj und P. Balaram, Acc. Chem. Res. 14, 356-362 (1981)

(36) R. Lupp, Dissertation, Universität Tübingen (1983)

(37) S. Klumpp, G. Jung und J.E. Schultz, Eur. J. Biochem., im Druck

(38) W. Hanke und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 596, 456-462 (1980)

(39) R. Latorre und J.J. Donovan, Acta Physiol. Scan. Suppl. 481, 37-45 (1980)

(40) M.K. Mathew und P. Balaram, Molec. Cell. Biochem. 50, 47-64 (1983)

(41) J.E. Hall, T.M. Balasubramanian, A. Hing und G.R. Marshall, 8th. Amer. Pept. Symposium 1983, Abstr. 7-E

(42) G. Boheim, W. Hanke und G. Jung, Biophys. Struct. Mech. 9, 181-191 (1983)

(43) G. Schwarz und P. Savko, Biophys. J. 39, 211-219 (1982)

(44) R.E. Yantorno, S. Takashima und P. Mueller, Biophys. J. 38, 105-110 (1982)

(45) W. Hanke, C. Methfessel, H.-U. Wilmsen, E. Katz, G. Jung und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 727, 108-114 (1983)

(46) R. Oekonomopulos, Dissertation, Universität Tübingen (1978)

(47) W. Mayr, Dissertation, Universität Tübingen (1979)

(48) J.C. Sheean, M. Goodman und G.P. Hess, J. Am. Chem. Soc. 77, 1067-1068 (1955)

(49) J.C. Sheean, M. Goodman und G.P. Hess, J. Am. Chem. Soc. 78, 1367-1369 (1956)

(50) W. König und R. Geiger, Chem. Ber. 103, 788-789 (1970)

(51) T. Wieland und H. Bernhard, Liebigs Ann. Chem. 572, 190-194 (1951)

(52) J.R. Vaugham, J. Am. Chem. Soc. 73, 3547 (1951) (1951)

(53) F. Weygand, P. Huber und K. Weiss, Z. Naturforsch. 22 b, 1084-1085 (1967)

(54) F. Flor, C. Birr und T. Wieland, Liebigs Ann. Chem. 1973, 1601-1605

(55) G. Becker, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1981)

(56) M. Bergmann, L. Zervas und H. Rinke, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 224, 40- (1934)

(57) A.R. Battersby und J.C. Robinson, J. Chem. Soc. 1955, 259-269

(58) G. Jung, W.A. König, D. Leibfritz, T. Ooka, K. Janko und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 433, 164-181 (1976)

(59) W. Mayr und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1980, 1489-1506

(60) R. Oekonomopulos, G. Jung und D. Leibfritz, Tetrahedron 38, 2157-2184 (1982)

(61) H. Brückner und G. Jung, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1677-1699

(62) G. Jung, H. Brückner, R. Bosch, W. Winter, H. Schaal und J. Strähle, Liebigs Ann. Chem. 1983, 1096-1106

(63) P.Y. Chou und G.D. Fasman, Biochemistry 13, 211-222 und 222-245 (1974)

(64) P.Y. Chou und G.D. Fasman, J. Mol. Biol. 74, 263-281 (1973)

(65) P.Y. Chou und G.D. Fasman, Adv. Enzym. 47, 45- (1977)

(66) P.Y. Chou und G.D. Fasman, Annu. Rev. Biochem. 47, 251-276 (1978)

(67) T.P. Hopp und K.R. Woods, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 78, 3824-3828 (1981)

(68) G. Walter und R.F. Doolittle, Genetic Engeneering 5, 61-91 (1982)

(69) M. Levitt, J. Mol. Biol. 104, 59-107 (1976)

(70) T.P. Hopp und K.R. Woods, Mol. Immunol. 20, 483-489 (1982)

(70a) J. Kyte und R.F. Doolittle, J. Mol. Biol. 157, 105-132 (1982)

(71) L. Pauling und R.B. Corey, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 37, 235-285 und 729-740 (1951)

(72) J.A. Schellman und P. Oriel, J. Chem. Phys. 37, 2114-2124 (1962)

(73) C. Toniolo, G.M. Bonora, S. Salardi und M. Mutter, Macromolecules 12, 620-625 (1979)

(74) W. Moffitt, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 42, 736 (1956)

(75) A.D. McLachlan, Proc. Roy. Soc. (London) A 297, 131 (1967)

(76) S.N. Timasheff, R. Townend und L. Mescanti, J. Biol. Chem. 241, 1863-1870 (1966)

(77) H. Rosenkranz und W. Scholtan, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 896-904 (1971)

(78) N. Greenfield und G.D. Fasman, Biochem. 8, 4108-4116 (1969)

(79) Y.-H. Chen, J.T. Yang und K.H. Chou, Biochem. 13, 3350-3359 (1974)

(80) C.M. Venkatachalam, Biopolymers 6, 1425-1436 (1968)

(81) P.Y. Chou und G.D. Fasman, J. Mol. Biol. 115, 135-175 (1977)

(82) G. Jung, R. Bosch, E. Katz, H. Schmitt, K.-P. Voges und W. Winter, Biopolymers 22, 241-246 (1983)

(83) G. Schwarz und P. Savko, Biophys. J. 39, 211-219 (1982)

(84) V. Rizzo, G. Schwarz, K.-P. Voges und G. Jung, im Druck

(85) R.E. Yantorno, S. Takashima und P. Mueller, Biophys. J. 38, 105-110 (1982)

(86) T. Sano und G. Schwarz, Biochim. Biophys. Acta 745, 189-193 (1983)

(87) G. Schwarz, P. Savko und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta 728, 419-428 (1983)

(88) D. Bach in: Biomembrane Structure and Function (D. Chapman, Hrsg.)

(89) J.M. Steim, Methods in Enzymology 32, 262-272 (1974)

(90) T.Y. Tsong, R.P. Hearn, D.P. Wrathall und J.M. Sturtevant, Biochem. 9, 2666-2677 (1970)

(91) H.-J. Hinz und J.M. Sturtevant, J. Biol. Chem. 247, 6071-6075 (1972)

(92) G. Darland, T.D. Brock, W. Samsonoff und S. Conti, Science 170, 1416-1418 (1970)

(93) R.T. Belly und T.D. Brock, J. Gen. Microbiol. 73, 465-473 (1972)

(94) K.J. Mayberry-Carson, T.A. Langworthy, W.R. Mayberry und P.F. Smith, Biochim. Biophys. Acta 360, 217-229 (1974)

(95) M.J. Ruwart und A. Haug, Biochem. 14, 860-866 (1975)

(96) C. Mollay, FEBS-Lett. 64, 65-68 (1976)

(97) D. Papahadjopoulos, M. Moscarello, E.H. Eylar und T. Isac, Biochim. Biophys. Acta 401, 317-335 (1975)

(98) H.K. Kimelberg und D. Papahadjopoulos, J. Biol. Chem. 81, 483-504 (1974)

(99) K. Jacobson und D. Papahadjopoulos, Biochem. 14, 152-161 (1975)

(100) H. Kimelberg und D. Papahadjopoulos, J. Biol. Chem. 246, 1142-1148 (1971)

(101) H.K. Kimelberg und D. Papahadjopoulos, Biochim. Biophys. Acta, 233, 805-809 (1971)

(102) D. Chapman und J. Urbina, FEBS-Lett. 12, 169-172 (1971)

(103) D. Chapman, J. Urbina und K.M. Keough, J. Biol. Chem. 249, 2512-2521 (1974)

(104) T. Gulik-Krzywicki, E. Shechter, V. Luzzati und M. Fause, Nature 223, 1116-1121 (1969)

(105) W. Curatolo, J.D. Sakura, D.M. Small und G.G. Shipley, Biochem. 16, 2313-2319 (1977)

(106) J.M. Boggs und M.A. Moscarello, Biochem. 17, 5734-5739 (1978)

(107) R.J. MacDonald und R.C. MacDonald, J. Biol.Chem. 250, 9206-9214 (1975)

(108) E.J.J. van Zoelen, P.M.W. van Dijck, B. DeKruiff, A.J. Verkleij und L.L.M. van Deenen, Biochim. Biophys. Acta 514, 9-24 (1978)

(109) D. Chapman, B.A. Cornell, A.W. Eliasz und A. Perry, J. Mol. Biol. 113, 517-538 (1977)

(110) R.M. Epand und J.M. Sturtevant, Biochem. 20, 4603-4606 (1981)

(111) E. Grell, T. Funck und F. Eggers, Membranes 3, 1-11 (1975)

(112) L. Langmuir, J. Am. Chem. Soc. 39, 1848 (1917)

(113) G.L. Gaines in: Insoluble Monolayers of Liquid-Gas Interfaces, Interscience, New York (1966)

(114) O. Albrecht, Dissertation, Universität Mainz (1979) und dort zitierte Literatur

(115) L. Gros, H. Ringsdorf und H. Schupp, Angew. Chem. 93, 311-332 (1981)

(116) H. Schindler und G. Feher, Biophys. J. 16, 1109-1113 (1976)

(117) I. Vodyanoy, J.E. Hall, T.M. Balasubramanian und G.R. Marshall, Biochim. Biophys. Acta 684, 53-58 (1982)

(118) G. Boheim, G. Irmscher und G. Jung, Biochim. Biophys. Acta, 507, 485-506 (1978)

(119) G. Boheim, persönl. Mitteilung

(120) W. Hanke, C. Methfessel, H.-U. Wilmsen, E. Katz, G. Jung und G. Boheim, Biochim. Biophys. Acta 727, 108-114 (1983)

(121) L. Moroder, A. Hallett, E. Wünsch, O. Keller und G. Wersin, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1651-1653 (1976)

(122) K.-H. Deimer, P. Thamm und P. Stelzel, in Methoden der Organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller), Bd. XV/1, S. 317, Thieme, Stuttgart 1974

(123) G. Pataki, Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptidchemie, DeGruyter, Berlin 1966

(124) E. von Arx, M. Faupel und M. Brugger, J. Chromatogr. 120, 224-228 (1976)

(125) H. Frank, W. Woiwode, G. Nicholson und E. Bayer, Liebigs Ann. Chem. 1981, 354-356

Danksagung

Neben den bereits im Text erwähnten Personen danke ich herzlich allen Laborkollegen für die stets bereitwillig gewährte Unterstützung, insbesondere Herrn Klaus-Peter Voges für zahlreiche NMR-Messungen und viele Freundschaftsdienste.

Ferner danke ich den Herren H. Allmendinger, V. Muschalek, L. Rupp und G.J. Nicholson für die Unterstützung bei der Durchführung der D/L-Tests.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

E. Bayer, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, G. Häfelinger, H. Hagenmaier, M. Hanack, V. Hoffmann, G. Jung, Frau S. Kemmler-Sack, D. Krug, U. Kunze, E. Lindner, I.P. Lorenz, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, V. Schurig, F.F. Seelig, H. Stegmann, J. Strähle, H. Suhr, W. Voelter und W. Zeil.

LEBENSLAUF

Gerhard Becker

3. 2. 1954	geboren in Offenburg als Sohn des Oberlehrers Theo Becker und seiner Frau Beate, geb. Völker
1961 - 1965	Volksschule in Hinter-Lehengericht
1965 - 1973	Gymnasium in Schramberg
1973	Abitur
1973/74	Wehrdienst in Stetten a.k.M.
WS 1974/75	Immatrikulation an der Universität Tübingen, Studienrichtung: Chemie, Diplom
Sept. 1980	Diplom-Hauptprüfung
1980/81	Diplomarbeit unter Anleitung von Prof. Dr. G. Jung: "Chemische Synthese des Decapeptid-Segments 11-20 von menschlichem Lymphoblasteninterferon."
Okt. 1981 - Juli 1984	Durchführung der experimentellen Doktorarbeit "Synthese membranmodifizierender Proteinsegmente mit konformationsstabilisierten lipophilen α-Helices."

Seit März 1982 verheiratet mit Dorothe Becker, geb. Eberhardt

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45